

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6408

**Identifizierung von metastasierungsassoziierten Genen
durch differenzielle Analyse (SSH)
und weiterführende
Expressionsstudien in humanen Tumoren**

von

Andrea Silke Nestl

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2000

**Identifizierung von metastasierungsassoziierten Genen
durch differenzielle Analyse (SSH)
und weiterführende
Expressionsstudien in humanen Tumoren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

von

Andrea Silke Nestl

Karlsruhe

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.1999

Referent: Prof. Dr. P. Herrlich

Korreferent: PD Dr. H. Krug

Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention, Diagnostik und Behandlung von Krebs erfordert das Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorgenese und Metastasierung. Das Wissen über die Gene, welche in die Metastasierung involviert sind, ist noch sehr unvollständig. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung umfassender Veränderungen der Genexpression, die für die Entwicklung des metastatischen Phänotyps in Brusttumorzellen verantwortlich sind.

Durch Differenzanalyse (SSH, *suppressive subtractive hybridization*) gelang es mir in der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung eines Tumorprogressionssystems der Ratte 162 metastasierungsassoziierte Gensequenzen zu identifizieren. Mehr als die Hälfte dieser Sequenzen zeigt keine signifikante Homologie zu bekannten Genen. Die Expression einiger dieser Gene wurde in verschiedenen Tumorzellen der Ratte und des Menschen analysiert. Zusätzlich wurde die Expression zweier ausgewählter Gene in invasiven menschlichen Primärtumoren unter Verwendung der *in-situ*-Hybridisierungstechnik untersucht.

Die erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß metastasierende Zellen unterschiedlicher Tumorarten viele gemeinsame Gene hochregulieren. Erstens sind einige der bekannten Gene, welche durch die Subtraktion identifiziert wurden, bereits als tumorprogressions-assoziiert beschrieben worden (z.B. c-Met, Ezrin, Oncomodulin und Cathepsin). Zweitens konnte durch *Northern-Blot*-Analysen gezeigt werden, daß viele der identifizierten Gene, die differenziell exprimiert sind, auch in anderen Tumorprogressionssystemen in einer metastasierungsspezifischen Art und Weise exprimiert werden. Drittens sind die beiden für die *in-situ*-Hybridisierungsanalyse ausgewählten Gene, S7 und CD24, spezifisch in den Tumorzellen der humanen intraduktalen Karzinome des Kolorektums und der Brust hochreguliert. In den Epithelien der kolorektalen Karzinomproben hingegen konnte jeweils nur eine sehr schwache Expression detektiert werden.

Somit konnte exemplarisch an zwei Beispielen die Identifikation von Markergenen für den metastatischen Phänotyp bei humanen Tumoren demonstriert werden, wobei eine Verbindung von S7 zu Tumorgenese und -progression bislang noch unbekannt war.

Identification of metastasis-related genes by differential analysis (SSH) and further expression studies in human tumors

Abstract

In order to develop new strategies for the prevention, diagnosis and treatment of cancer there is a need to understand the molecular mechanism of tumorigenesis and metastasis. The knowledge about genes involved in metastasis is still very incomplete. The goal of this thesis was to identify comprehensive alterations of gene expression which are responsible for the establishment of the metastatic phenotype of breast tumor cells.

Using differential analysis (SSH, *suppressive subtractive hybridization*) in a tumor progression model of the rat I was able to identify 162 metastasis-associated genes. More than half of these sequences showed no significant homology to known genes. The expression of some of these genes was analysed in several tumor cells of rat and human origin. In addition the expression of two selected genes was analyzed in human invasive primary tumors by using the in situ hybridization technique.

From the experiments one can conclude that metastasizing tumor cells from different tumor types have many upregulated genes in common. Firstly, some of the known genes isolated in the subtraction have previously been associated with tumor progression (e.g. c-met, ezrin, oncomodulin and cathepsin). Secondly, the northern blots show that many of the differentially expressed genes are also expressed in a metastasis-specific fashion in other tumor progression models. Thirdly, the two genes selected for in situ hybridization analysis were strongly upregulated in tumor cells of human colorectum and breast intraductal carcinomas. In the epithelium of the colorectal carcinomas there was only weak detectable expression.

The identification of marker genes for the metastatic phenotype of human tumors could be demonstrated with these two examples, in addition S7 has not been described before in relation to tumorigenesis and tumor progression.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Einleitung	3
Material	16
Methoden	22
1. <u>Analyse von Nukleinsäuren</u>	22
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	
Präzipitation von Nukleinsäuren aus wäßriger Lösung	
2. <u>DNA-Methoden</u>	23
2.1 DNA-Präparation	23
Plasmid-DNA Minipräparation	
Plasmid-DNA Maxipräparation	
2.2 Klonierungstechniken	24
Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen	
Ligation von DNA-Fragmenten	
<i>Polymerase Chain Reaction</i>	
Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	
Zweitstrang-cDNA-Synthese	
Sequenzierung doppelsträngiger DNA	
Präparation elektrokompenter Bakterien	
Elektrotransformation von Bakterien	
Herstellung von Selektiv-Agarplatten	
Einfrieren von Bakterien	
2.3 DNA-Gelelektrophorese	28
Agarose-Horizontalgelelektrophorese	
DNA-Isolation aus Agarose-Gelen	
3. <u>RNA-Methoden</u>	29
Präparation von poly(A) ⁺ RNA aus Zellen	
Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe	
Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	

4. <u>Transfer- und Hybridisierungstechniken</u>	31
Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	
<i>Northern-Blot</i> -Verfahren	
<i>Southern-Blot</i> -Verfahren	
Radioaktive Hybridisierung des <i>Northern</i> -, bzw. <i>Southern-Blots</i>	
5. <u>Zellkultur</u>	33
Passagieren von Zellen	
Einfrieren und Auftauen von Zellen	
6. <u>Histologische Techniken</u>	34
Fixierung von Geweben	
Einbettung in Paraffin	
Markierung von RNA durch <i>in vitro</i> -Transkription	
Radioaktive Markierung von RNA durch <i>in vitro</i> -Transkription	
Nicht radioaktive Markierung von RNA durch <i>in vitro</i> -Transkription	
<i>In-situ</i> -Hybridisierung	
Radioaktive <i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH)	
Nicht radioaktive <i>In-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	
7. <u>Differenzielle Subtraktion</u>	39
Herstellung einer subtrahierten Bank mittels SSH	
Abänderung des Protokolls: 2. Hybridisierungsrunde	
Überprüfung der Subtraktionseffizienz/Driver cDNA-Amplifikation	
Ligation in einen TA-Vektor	
Transformation in elektrokompente Bakterien und Blau/Weiß-Sortierung	
Picken von Klonen und Kolonie-PCR	
<i>Reverse-Northern-Blot</i> -Analyse	
Herstellung von Hybridisierungssonden der isolierten cDNA-Fragmente	
Ergebnisse	43
1 <u>Das 13762NF-Rattenadenokarzinomsystem</u>	43
2 <u>Subtraktive Klonierung von differenziell exprimierten Genen</u>	45
2.1 Prinzip der <i>Suppressive Subtractive Hybridization</i> (SSH)	45
2.2 Durchführung der Subtraktionsreaktion	45
2.3 Eliminierung gemeinsam in Tester- u. Driver-Zellen exprimierter Gene durch die SSH	49
2.4 Analyse von Klonen der Subtraktionsbank ML	50

Inhaltsverzeichnis

3 <u>Charakterisierung der differenziell exprimierten Klone</u>	52
3.1 <i>Northern-Blot</i> -Analyse und Kontrollsequenzierung von stichprobenartig gewählten Klonen	52
3.2 Identität aller differenziell exprimierten Gene	53
4 <u>Bestätigung der differenziellen Expression durch <i>Northern-Blot</i>-Analyse</u>	63
5 <u>Expressionsstudie der metastasierungsassoziierten Gene in anderen Tumorprogressionssystemen</u>	64
5.1 Verwendete Modellsysteme	64
5.2 Zusammenhang zwischen Expression bereits identifizierter Gene und dem metastatischen Potential von Zelllinien	66
5.3 Zusammenhang zwischen Expression bisher unbekannter Gene und dem metastatischen Potential von Zelllinien	72
6 <u>CD24 und S7 als potentielle Marker in humanen Tumoren</u>	76
6.1 Expressionsstudien von S7 in menschlichen Tumoren durch <i>Northern-Blot</i> -Analyse	76
6.2 Expressionsstudien von CD24 und S7 in menschlichen Tumoren durch <i>in-situ</i> -Hybridisierung	77
6.2.1 Expression von CD24 in humanen Tumoren	79
6.2.2 Expression von S7 in humanen Tumoren	81
7 <u>Expression von CD24 und S7 in verschiedenen Rattengeweben</u>	83
Diskussion	86
Literatur	98

Abkürzungen

Abb	Abbildung	µg	Mikrogramm
Amp	Ampicillin	µm	Mikrometer
		µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ Molar)
bp	Basenpaar	µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
		°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat		
cm	Zentimeter		
cDNA	zur RNA komplementäre (<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure)		
cpm	radioaktiver Zerfall pro Minute (<i>counts per minute</i>)		
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat		
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat		
DD	Differential Display		
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTP's	Desoxy-Nukleositriphosphate		
DTT	Dithiothreitol		
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat		
E _{260,280}	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm		
<i>E.coli</i>	Escherichia coli		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
ER	Östrogenrezeptor		
EST	exprimiertes cDNA-Stück (<i>expressed sequence tag</i>)		
et al.	und andere (<i>et alii</i>)		
EtOH	Ethanol		
f.c.	Endkonzentration ("final concentration")		
FCS	fötales Kälberserum		
FISH	Floureszens-markierte <i>In situ</i> -Hybridisierung		
g	Gramm		
g	relative Erdbeschleunigung		
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase		
h	Stunde		
kb	Kilobasen		
KD	Kilodalton		
IAP	Inhibitor of Apoptosis		
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung		
l	Liter		

Abkürzungen

m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
MGF	<i>Megakaryocyte potentiating factor</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Na-Acetat	Natriumazetat
ng	Nanogramm
nm	Nannometer
OD	optische Dichte
p.a.	Analyse-rein
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunde
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSH	<i>Suppressive Subtractive Hybrdization</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethal)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen

Einleitung

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für mehr als hundert verschiedene Formen benigner und maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe des Körpers kann kanzerogen entarten und manchmal sogar mehrere unterschiedliche Arten von Tumoren hervorbringen. Das eigentliche Problem stellt jedoch nicht ein solcher Primärtumor dar, der durch die Mittel der modernen Medizin oft erfolgreich behandelt werden kann, sondern die Entstehung von Sekundärtumoren an anderen Stellen des Körpers, die für die hohe Todesrate bei Krebserkrankungen verantwortlich sind. Über die genetischen Hintergründe dieses metastatischen Verhaltens der Tumoren ist noch nicht viel bekannt. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Identifizierung genau der Gene, die spezifisch in metastasierenden Zellen überexprimiert werden.

Im folgenden soll ein Überblick über die Entstehung und Progression von Tumoren gegeben werden.

Die Entstehung eines Tumors kann vielfältige Ursachen haben. Es gibt Tumore, die durch Viren wie Papilloma-, Hepatitis-B- und -C-Viren oder RNA-Tumorviren ausgelöst werden können. In einzelnen Fällen kann Blasenkrebs durch den Helminthen *Schistosoma* verursacht werden. Darüberhinaus wurde eine Beteiligung des Bakteriums *Helicobacter pylori* an der Bildung von Magenkrebs diskutiert (Eckert, 1997). Die Entstehung der meisten Tumore basiert jedoch auf spontanen oder vererbten genetischen Veränderungen (Mutationen). Die spontanen Veränderungen können ihrerseits durch exogene Mutagene wie UV- und radioaktive Strahlung oder kanzerogene Stoffe ausgelöst werden.

Diese genetischen Alterationen können durch genetische Instabilität, Hypomethylierung der DNA oder Mutationen bestimmter Gene verursacht werden. Unter genetischer Instabilität versteht man Vorgänge, die das Genom verändern (Übersichtsartikel: Lengauer et al., 1998). Sie können sich entweder auf Nukleotidebene abspielen und die Funktion von Reparaturgenen beeinträchtigen (Cairns, 1981; Aaltonen et al., 1993), in einer Veränderung der Chromosomenzahl resultieren (Zhuang et al., 1998), zur Translokation von Chromosomen führen (Elledge et al., 1996) oder durch die Amplifikation von Genen gekennzeichnet sein (Yin et al., 1992). Die Hypomethylierung von DNA kann ihrerseits zu genetischer Instabilität beitragen, indem sie durch Verhinderung der Chromosomenkondensation eine normale mitotische Chromosomentrennung behindert (Schmid et al., 1984).

Nachdem schon lange vermutet wurde, daß Krebs durch einen mehrstufigen Prozeß ausgelöst wird (Foulds, 1958) gelang die Identifikation der ersten molekularen Komponenten jedoch erst dreißig Jahre später (Bishop 1987; Weinberg 1989). Heute gilt es als allgemein anerkannte Tatsache, daß Krebs nicht nur durch eine einzige Mutation entsteht, sondern durch die Anhäufung mehrerer Mutationen.

Aus einer Vielzahl experimenteller Daten entwickelten Fearon & Vogelstein (1990) das Multi-Hit-Modell zur schrittweisen Tumorigenese (Abb. 1), welches auf der Tumorigenese im kolorektalen Karzinom basiert. Es begründet sich darauf, daß sich Tumoren in einem Prozeß klonaler Evolution entwickeln, der durch Mutationen gesteuert wird, wobei jeder Krebs aus einer einzelnen Vorläuferzelle (klonales Wachstum) entsteht. Die klonale Evolution wird dadurch möglich, daß eine genetische Veränderung zu einem Wachstumsvorteil für die betreffende Zelle gegenüber anderen neoplastischen Zellen des Tumors führen kann, so daß sie zum dominanten Zelltyp des Tumors wird. Es wird davon ausgegangen, daß mindestens fünf Mutationen notwendig sind, damit sich aus einer normalen Zelle ein invasiver Tumor entwickelt. Im letzten, entscheidenden Schritt der Entwicklung eines invasiven aus einem lokal wachsenden Karzinom ereignen sich noch weitere Veränderungen, die allerdings noch weitgehend unbekannt sind. Die Identifikation dieser transkriptionellen Veränderungen im Brustkarzinom wird in der vorliegenden Arbeit angestrebt.

Im kolorektalen Tumor stellen kleine benigne (nicht metastatische) Tumore (Adenome) die erste Manifestation von Neoplasie im Epithel dar. Diese Tumore sind nur ein paar mm groß und in ihrer intra- und interzellulären Organisation nahezu normal. Mit der Zeit wachsen diese Tumore, werden disorganisiert. Bei Häufung einer ausreichenden Zahl von Mutationen kann sich daraus ein invasives Karzinom entwickeln.

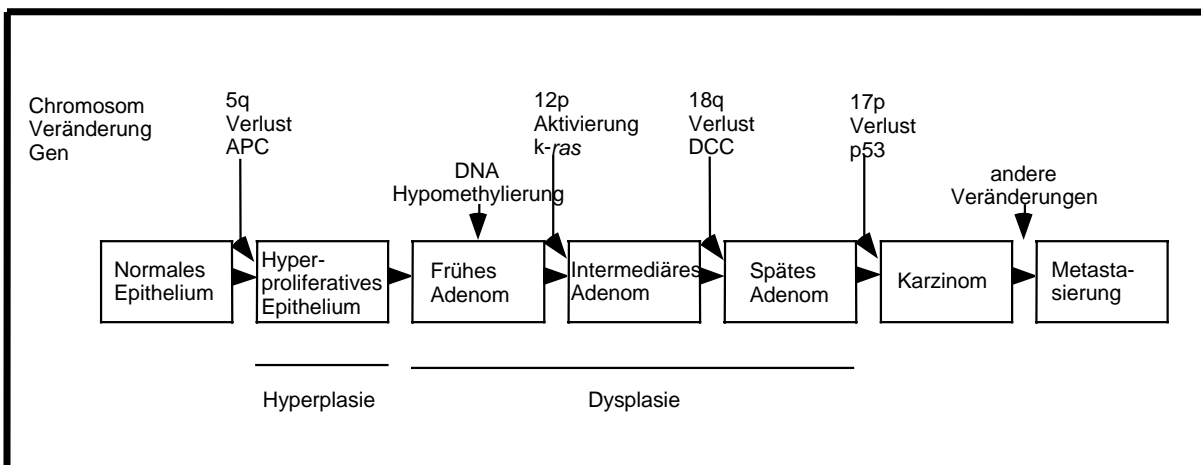


Abb.1 Ein genetisches Modell für die schrittweise kolorektale Tumorigenese. Als Beispiele für Veränderungen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen sind APC, *k-ras*, DCC und p53 aufgeführt. Die Anzahl tatsächlich involvierter Gene kann ebenso variieren wie die Art der Gene. Nicht die Reihenfolge, sondern die Anhäufung der Ereignisse ist ausschlaggebend für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms. Diese Entwicklung kann sich über mehrere Jahrzehnte hinziehen, nach Fearon & Vogelstein, 1990.

Wichtiger als die Reihenfolge der vorgestellten Mutationen ist ihre Anhäufung. Die Veränderungen bei den Tumorsuppressorgenen (s. nächster Abschnitt) APC, DCC und p53, sowie dem Onkogen (s. nächster Abschnitt) *k-ras* sind als Beispiele aufgeführt; sie ereignen sich mit ähnlicher Häufigkeit in allen untersuchten, ethnisch und geographisch, unterschiedlichen Populationen (Vogelstein *et al.*, 1988). In analoger Weise kann die Tumorgenese auch durch Veränderungen anderer Gene induziert werden.

Ein anderer Aspekt, der durch das *Multi-Hit*-Modell der Tumorprogression verdeutlicht wird, ist der altersabhängige Anstieg der Krebsrate. Meist bedarf es mehrerer Jahrzehnte, um genügend Mutationen zur Bildung eines invasiven Karzinoms anzuhäufen. Ein Beispiel dafür sind Tuberkulose-Patienten, die mit radioaktiver Strahlung behandelt worden waren und erst 15 Jahre später Krebs entwickelten (Boice & Monson, 1977). Die radioaktive Schädigung der DNA stellte bei diesen Patienten ein frühes Mutationsereignis dar, dem zur Entwicklung von Krebs noch weitere folgen mußten.

Nach einer Definition von Kinzler & Vogelstein (1998) werden durch genetische Veränderungen die Funktionen von *Gatekeepern*, *Caretakern* und *Landscapern* unterbrochen. Diese Defekte beziehen sich auf Veränderungen in Genen (*gatekeepers* and *caretakers*) wie Mutation, oder Veränderungen der Mikro-Umgebung (*landscapers*). Bei den Genen, die hier als *gatekeeper* und *caretaker* bezeichnet werden, handelt es sich um Tumorsuppressorgene im engeren und weiteren Sinne. Unter Tumorsuppressorgenen versteht man Gene, deren Inaktivierung an der neoplastischen Tumorformation beteiligt ist. Ein Dutzend Tumorsuppressorgene, welche Krebs durch direkte Kontrolle des Zellzyklus verhindern, sog. *Gatekeeper*, sind bekannt (z.B. p53, Rb, VHL, APC). Diesen traditionellen Tumorsuppressorgenen steht eine immer größer werdende Zahl von Genen gegenüber, die indirekt Neoplasie unterdrücken (z.B. XPB, ATM, MSH2, MLH1). Sie kodieren u.a. für Reparaturproteine (*mismatch-repair*) und funktionieren als *Caretaker* im Genom; ihre Inaktivierung kann zu genetischer Instabilität führen (Kinzler & Vogelstein, 1997; Kinzler & Vogelstein, 1998). Ein Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens kann sowohl durch Inaktivierung beider Allele entstehen, als auch durch "dominant negative" oder dosisabhängige Effekte bei Inaktivierung nur eines Allels (Hoffman & Edelman, 1983; Knudson, 1985; Kraiss *et al.*, 1988).

Onkogene sind Gene, deren Produkte die Fähigkeit haben, eukaryotische Zellen zu transformieren, so daß diese in analoger Weise zu Tumorzellen wachsen. Es handelt sich dabei um überexprimierte oder mutierte Formen der Proto-Onkogene, deren normale Funktion im weitesten Sinne mit der Regulation des Zellwachstums zu tun hat. Ihre Genprodukte sind Wachstumsfaktoren, sowie deren Rezeptoren, Hormonrezeptoren, Signaltransduktionskomponenten oder Transkriptionsfaktoren. Bei viralen Onkogenen

Einleitung

(RNA-Tumorviren, Oncornaviren) handelt es sich nicht primär um virale, sondern um bei Mensch und Tieren weitverbreitete, normale, zelluläre Gene, die von den Oncornaviren in ihren Wirtszellen erworben und auf neue Zellen übertragen werden können. Sie transferieren nicht ein zelluläres Onkogen (c-onc), sondern sein Transkript (v-onc), eine RNA, die nicht in allen Teilen dem zellulären Proto-Onkogen entspricht (Deletion, Muta-

Gen	Tumorart	Genklasse
APC	Dickdarm- und Magenkrebs	Tumorsuppressorgen
Bcl-1 (Cyclin D1)	Brustkrebs und Tumoren im Kopf- und Hals-Bereich (Zellzyklusstimulation)	Onkogen
Bcl-2	beteiligt am follikulären B-Zell-Lymphom (Apoptoseinhibition)	Onkogen
BRCA-1	Krebs von Brust, Eierstöcke	Tumorsuppressorgen
BRCA-2	Brustkrebs (beide Geschlechter)	Tumorsuppressorgen
c-myc	beteiligt an Leukämien, sowie Krebs von Brust, Magen und Lunge	Onkogen
CDK4	Melanom	Tumorsuppressorgen
DCC	Dickdarmkrebs	Tumorsuppressorgen
DPC4	beteiligt an Pankreaskrebs (Inhibition der Zellteilung)	Tumorsuppressorgen
erb-B	Brustkrebs und Glioblastom	Onkogen
erb-B2 (HER-2, neu)	Krebs von Brust, Speicheldrüsen, Eierstöcke	Onkogen
Ki-ras	Krebs von Lunge, Eierstöcke, Dickdarm, Pankreas	Onkogen
MDM2	Sarkome u. a. (p53-Gegenspieler)	Onkogen
MLH1	Krebs von Dickdarm, Gebärmutterschleimhaut u. a.	Fehlpaarungsreparatur (<i>mismatch repair</i>)
MSH2	Krebs von Dickdarm, Gebärmutterschleimhaut u. a.	Fehlpaarungsreparatur
MTS 1 (p16)	Melanom, Pankreaskrebs (Zellzyklusinhibition)	Tumorsuppressorgen
N-myc	beteiligt am Neuroblastom und Glioblastom	Onkogen
N-ras	beteiligt an Leukämien	Onkogen
NF-1	Neurofibrom, Tumore d.periph.Nervensystem	Tumorsuppressorgen
NF-2	myeloischer Leukämie (Inhibition von ras)	
	Gehirntumore (wie Schwannome) u.a.	Tumorsuppressorgen
p53	beteiligt an weitem Spektrum von Tumoren (Zellzyklusstop + Apoptose abnormer Zellen)	Tumorsuppressorgen
PDGF	Gliom	Onkogen
PMS1,2	Dickdarmkrebs u. a.	Fehlpaarungsreparatur
RB	Retinoblastom, Sarkom u.a. (Zellzyklusinhibition)	Tumorsuppressorgen
RET	Schilddrüsenkrebs	Onkogen
VHL	Nierenkrebs u.a	Tumorsuppressorgen
WT-1	Wilmtumor (Nierenkrebs) u.a.	Tumorsuppressorgen

Tabelle 1 Übersicht über die wichtigsten Tumorsuppressor- und Onkogene

tion). Auch der Einbau des Promotors eines Oncornavirus (Insertionsmutagenese) kann zur Überaktivierung eines Proto-Onkogens und damit zu einem Tumor führen. Eine Übersicht über die wichtigsten der identifizierten Onkogene und Tumorsuppressorgene ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Durch diese zahlreichen genetischen Veränderungen wird die Basis für invasives Verhalten von Zellen eines Tumors geschaffen. Dieses invasive Verhalten ist dadurch gekennzeichnet, daß Tumorzellen zuerst den primären Tumor verlassen, das umgebende normale Gewebe durchwandern, dann in die Blut- und/oder lymphatischen Gefäße einwandern, in den Lymphknoten oder dem Mikro-Gefäßsystem verbleiben und schließlich das Parenchym und Stroma durchwandern, dort überleben und metastatische Kolonien bilden (Fidler *et al.*, 1978; Poste & Fidler, 1980). Eine schematische Übersicht der wichtigsten Vorgänge, die sich vom ersten transformierenden Ereignis bis hin zur Etablierung von Metastasen an anderen Stellen im Körper abspielen, ist in Abb. 2 dargestellt (Ahmad & Hart, 1996).

Die metastatische Kaskade

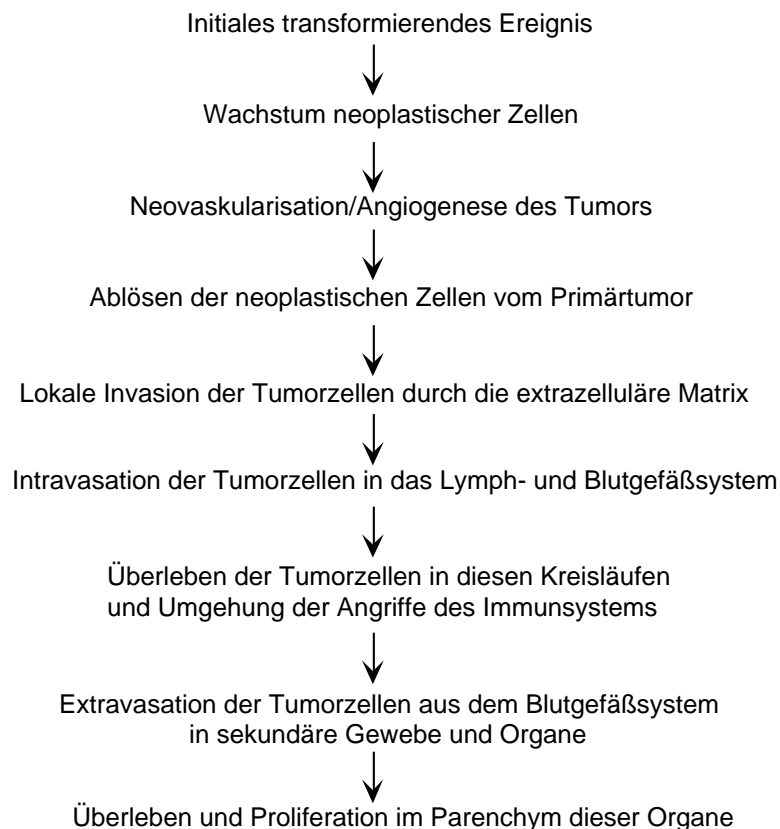


Abb. 2 Die metastatische Kaskade (Ahmad & Hart 1996)

Damit Tumorzellen invasieren können, müssen drei Grundvoraussetzungen geschaffen worden sein. Dies sind Veränderungen der Mikroumgebung, hauptsächlich Proteolyse, sowie Veränderungen der Adhäsionseigenschaften und Migration. Die **Proteolyse** ist notwendig, um die EZM (extrazelluläre Matrix) im interstitiellen Stroma und der Basalmembran, welche die Epithelzellen gegen das Bindegewebe abgrenzt, zu durchqueren. Tumorzellen erreichen dies durch Produktion und Sekretion von Proteasen (z.B. uPA, Cathepsine, Matrix-Metalloproteinasen), wobei sie mitunter durch umgebende Zellen dazu stimuliert werden, oder sie produzieren Faktoren, die bereits bestehende Proteasen aktivieren (Matrisian & Hogan, 1990; Newell *et al.*, 1994). Zu den wichtigsten Proteinasen gehören die Serin- und Metalloproteinasen (MMP) (Liotta *et al.*, 1991; Matrisian 1992), wie Matrilysin (Pajouh *et al.*, 1991), Kollagenasen (McDonnell *et al.*, 1991; Freije *et al.*, 1994), Stromelysine (Muller *et al.*, 1993; Newell *et al.*, 1994), MT-MMPs (membranständige MMPs Okada *et al.*, 1995) und Gelatinasen A und B (Nuovo *et al.*, 1995). Ein Gegengewicht zu den MMPs stellen ihre Inhibitoren, die TIMPs dar (*tissue inhibitor of metalloproteinases*; Williamson, 1990).

Veränderungen der **adhäsiven Eigenschaften** ereignen sich zwischen den Tumorzellen selbst, zwischen Tumor- und Stromazellen, Endothelzellen und dem interstitiellen Stroma, sowie der Basalmembran. Gleichartige Zellen eines Gewebes gehen homotypische Interaktionen ein; von heterotypischen Interaktionen spricht man z.B. bei der Adhäsion von Tumorzellen an die Endothelzellen der Blutgefäße. Für die Interaktionen der Zellen mit der EZM und die transendotheliale Wanderung im Blutgefäßsystem sind Integrine verantwortlich. Ein Beispiel dafür sind $\alpha\beta 1$ -Integrine, die Mediatoren für die Adhäsion metastatischer Tumorzellen an das vaskuläre Epithel der Lunge darstellen (Riuz *et al.*, 1993). In vielen Adenokarzinomen gilt erhöhte Expression des Lamininrezeptors 67LR als ein molekularer Marker für das metastatische Potential (Übersichtsartikel Montouri & Sobel, 1996).

Stellvertretend für andere Adhäsionsmoleküle, die eine Rolle bei der Metastasierung spielen, sei hier auf E-Cadherin und CD44 eingegangen. Verringerte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ist ein Charakteristikum vieler invasiver epithelialer Tumore und korreliert mit Tumorprogression, Dedifferenzierung, Invasion, Erhöhung des metastatischen Potentials und schlechter Prognose für den Patienten (z.B. Nicolson *et al.*, 1991; Kinsella *et al.*, 1994). Moleküle, die die Funktion von E-Cadherin aktivieren, wie IGF-1, RA und Tamoxifen, könnten in der Zukunft eine Rolle bei der Krebstherapie spielen (Bracke *et al.*, 1996). Das Adhäsionsmolekül CD44 wurde ursprünglich als sog. *lymphocyte homing*-Rezeptor beschrieben, der die Adhäsion von Lymphozyten an spezialisierte Endothelzellen in den HEV (*high endothelial venules*) vermittelt (Jalkanen *et al.*, 1986). *In vivo*-Expressionsstudien haben gezeigt, daß die Expression verschiedener Spleiß-Varianten von CD44 metastatisches Verhalten auslösen kann (Günthert *et al.*, 1991; Rudy *et al.*,

1993). Darüberhinaus konnte eine Expression varianter Formen von CD44 in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden (Übersichtsartikel: Ponta & Herrlich, 1998).

Die **Migration** ist der zentrale Prozeß der Metastasierung. Lokale Invasion, Intravasation und Extravasation der Tumorzellen werden nur durch aktive Beweglichkeit der Zellen möglich gemacht. Diese Beweglichkeit ist als eine Art pseudopodiale Vorwärtsbewegung zu verstehen, die durch parakrine und autokrine Faktoren stimuliert wird (Price *et al.*, 1997). Eine Unterscheidung dieser Faktoren kann je nach Art des Bewegungsauslösers vorgenommen werden. Die durch einen Wachstumsfaktor induzierbare chemotaktische Anziehung hat eine gerichtete Wanderung zur Folge. Die chemokinetische Anziehung hingegen resultiert in einer zufälligen Abwanderung von der Ausgangsposition und kann durch AMF (*autocrine motility factor*, Liotta *et al.*, 1986) und den SF/HGF (*scatter factor/hepatocyte growth factor*; Weidner *et al.*, 1993) ausgelöst werden. Eine haptotaktische Wanderung kann durch einen stationären Anziehungsfaktor in der EZM induziert werden (Brandley & Schnaar, 1989).

Damit die zu sekundären Orten gewanderten metastatischen Zellen sich weiter vermehren und Karzinome bilden können, ist die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Versorgung dieser Tumorzellen notwendig (Folkman, 1995). Unter normalen Bedingungen spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen, wie Embryogenese, Wundheilung und Menstruationszyklus (Folkman, 1971; Christenson *et al.*, 1996; Riesau, 1996). Der initiale Schritt für die Angiogenese in Tumoren scheint die mangelnde Blutversorgung und die daraus resultierende Hypoxie zu sein, worauf in einer *feedback*-Reaktion die Neovaskularisation induziert wird (Stein *et al.*, 1995). Diese *feedback*-Reaktion scheint durch VEGF/VPF (*Vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor*) vermittelt zu werden (Aiello *et al.*, 1994; Shweiki *et al.*, 1992). Darüberhinaus ist VEGF/VPF für die mikrovaskuläre Permeabilität mit verantwortlich und verursacht die Extravasation von Plasmaproteinen (Kondo *et al.*, 1993). Eine Korrelation zwischen der Expression von VEGF/VPF und Metastasierung konnte in verschiedenen Krebsformen gezeigt werden (Übersichtsartikel: Claffey & Robinson, 1996). Nach Bildung der neuen Blutgefäße ereignen sich weitere Interaktionen zwischen Wirtsorganismus und Tumor, die unter Einfluß von Zytokinen wie FGFs (*fibroblast growth factors*) und TNF- α (*tumor necrose factor*) zu verstärkter Vaskularisation, Tumorgroße und Metastasierung führen (Übersichtsartikel: Norrby, 1997).

In den letzten Jahren wurde beobachtet, daß Tumore durch Sezernierung von Molekülen in der Lage sind, die Angiogenese selbst zu beeinflussen (O'Reilly, 1996; 1997). In einzelnen Fällen konnte gezeigt werden, daß Primärtumore ihre eigene Angiogenese positiv beeinflussen, die ihrer Metastasen aber durch Sezernierung von Inhibitoren der Angiogenese, wie Angiostatin, hemmen. Nach Entfernung des Primärtumors kann diese

Inhibition aufgehoben werden und sog. "ruhende" Metastasen beginnen zu proliferieren und bilden Blutgefäße (O'Reilly, 1993; O'Reilly et al., 1994; Holmgren *et al.*, 1995).

Brustkrebs

Ein ganz besonderes Problem stellt die Bekämpfung von Brustkrebs dar. In den industrialisierten Ländern befällt diese Krankheit mehr Frauen als jeder andere Krebs und innerhalb der Gesamtbevölkerung ist sie die dritthäufigste Krebserkrankung. Im Jahre 1990 starben weltweit etwa 325.000 Frauen an Brustkrebs, womit diese Erkrankung für 16 % aller durch Krebs verursachten Todesfälle in den industrialisierten Ländern, bzw. 11 % in den Entwicklungsländern verantwortlich ist (Parkin *et al.*, 1992; s. **Abb. 3**). Ein Prozent aller Fälle von Brustkrebs tritt beim Mann auf (Übersichtsartikel: Levi *et al.*, 1996).

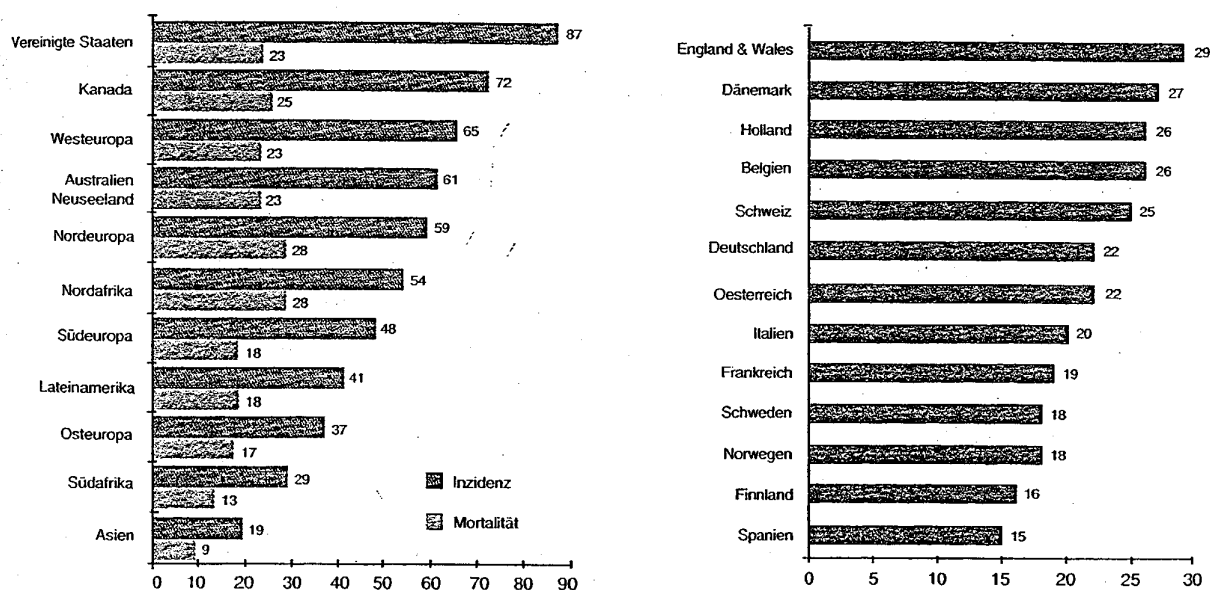


Abb. 3 Mortalität bei Brustkrebs. Links: Weltweite Inzidenz und Mortalität für Brustkrebs 1985. Im geographischen Vergleich sind die Unterschiede bei der Inzidenz des Brustkrebses ausgeprägter als bei der Mortalität. Während die Inzidenz ein Maß für die Belastung durch Brustkrebs darstellt, wird die Mortalität auch durch Behandlung und Früherkennung beeinflusst (bes. in den Industrieländern). **Rechts:** Brustkrebsmortalität in Europa, 1983-1987. Die Brustkrebsmortalität zeigt einen deutlichen Nord-Süd-Gradienten mit höheren Werten im Norden (La Vecchia *et al.*, 1992). Im gesamten ist die Mortalitätsrate in den meisten europäischen Ländern leicht gestiegen. (altersstandardisierte Raten pro 100.000 Bevölkerung, Weltstandard). Quelle: "Brustkrebs, Fakten und Handlungsbedarf", Bundesamt für Gesundheitswesen, Schweizerische Krebsliga, 1996 / WHO

Die hohe Mortalitätsrate von Brustkrebs erfordert dringenden Handlungsbedarf. Um wirkungsvoll diagnostizieren und therapieren zu können, müssen die molekulargenetischen Hintergründe der Tumorgenese und Metastasierung bekannt sein.

Zur Zeit sind einige wenige Moleküle bekannt, denen prognostische Bedeutung beigemessen wird. So scheint eine Überexpression von EGF-R , c-erbB-2 und *ras* mit schlechter Prognose verbunden zu sein. Ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von c-erbB-2 (HER2), Herceptin, ist momentan in der klinischen Testphase zur Behandlung von Patientinnen mit metastatischem Brustkrebs (Lee, 1995; Baselga *et al.*, 1998). Auch wenn tumorassoziierte Antigene wie CEA (*carcinoembryonic antigen*; Gold & Freeman, 1965) eingeschränkt bei Diagnose und Prognostik eingesetzt werden, gibt es noch keinen zuverlässigen Tumormarker, der allen Anforderungen (Diagnostik, Prognostik, Screening von Risikopatienten, bzw. Bevölkerungsgruppen) gerecht wird (Übersichtsartikel: O'Rourke, 1993).

Im folgenden sei ein Überblick über bereits bekannte Risikofaktoren und Prädispositionen für Brustkrebs gegeben. Auch hier wird das Alter als der bedeutendste Risikofaktor angesehen. Eine besondere Rolle bei der Auslösung von Brustkrebs scheinen Östrogene und Progesterone zu spielen (Übersichtsartikel: Levi *et al.*, 1996), auch in Form von Chemikalien, welche sowohl östrogene, als auch antiöstrogene Eigenschaften besitzen, wie bestimmte Metaboliten des DDT, Dioxinverbindungen und polychlorierte Biphenyle (PCB; Übersichtsartikel: Levi *et al.*, 1996). Eine Übersicht über die wichtigsten Gene, deren Veränderung eine genetische Prädisposition für Brustkrebs bedeutet, ist in der Tabelle 2 aufgeführt. Veränderungen des Tumorsuppressorgens BRCA1 scheinen bei mindestens 5 % aller Brustkrebsfälle beteiligt zu sein.

Gen	Chromosom	Organe mit erhöhtem Krebsrisiko bei Genmutation
BRCA1	17q21	Mutationen in über 80 Familien nachgewiesen, erhöhtes Krebsrisiko für Brust, Ovarien, Prostata, Dickdarm
BRCA2	13q12-13	Mutation assoziiert mit erhöhtem Krebsrisiko für die weibl. u. männl. Brust, Prostata, Magen, Kehlkopf, Melanom des Auges
Östrogenrezeptor	6q	Assoziation noch nicht bewiesen, Verdacht auf erhöhtes Krebsrisiko für die weibl. Brust
p53	17q13.1	Erhöhtes Risiko für Brustkrebs, Sarkome, Hirntumoren, Nebennierenrindenzarzinome, Leukämie
Ataxie-Teleangiektasie	11q22-23	Mutation in homozygoten Patienten, assoziiert mit Mammakarzinom, Lymphomen, Leukämien u.a. Karzinomen
Androgenrezeptor	Xq11.2-12	Mutationen in einigen Fällen männlichen Brustkrebses identifiziert.

Tabelle 2 Brustkrebsrisiko durch Keimbahnmutation. Bei BRCA-1/2 und p53 handelt es sich um Tumorsuppressorgene. Ataxie-Teleangiektasie ist eine mit erhöhter Strahlungsempfindlichkeit assoziierte Erbkrankheit und ist u.a. durch vermehrtes Auftreten verschiedener Krebserkrankungen gekennzeichnet.

Neben herkömmlichen klinischen Diagnosemethoden wie Palpation, Mammographie (Hurley & Kaldor, 1992), Magnetresonanz-Untersuchung und Sonographie (Bouchardy *et al.*, 1996), stellt das Satellitenverfahren eine Alternativmethode auf molekulargenetischer Basis dar, wodurch Abnormalitäten der Mikrosatelliten anhand von Blut- oder Urinproben von Patienten mit Blasenkrebs festgestellt werden können (Sidransky, 1996). Aufgrund defekter *Mismatch*-Reparatur weisen viele Tumorarten Veränderungen in ihren Mikrosatellit-Trakten wie Verlust oder Größenänderungen auf (MIN = *microsatellite instability*; Ionov *et al.*, 1993). Derartige Abnormalitäten weisen auf weiterreichende genetische Veränderungen, wie Verlust von Chromosomenteilen hin.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die verschiedenen Brustkrebsformen gegeben werden. Die Brust besteht aus einem funktionellen (epitheliales Gewebe) und einem strukturellen Anteil (Bindegewebe, Fett und Blutgefäße). Die häufigsten gutartigen und bösartigen Brusterkrankungen entstehen im Epithelgewebe. Zu den gutartigen, nicht invasiven Brustveränderungen gehören: Zysten (häufigste gutartige Veränderung), Hyperplasie (erhöhte epitheliale Proliferation), sklerosierende Adenose (Hyperplasie des Läppchen- und Myoepithels und Bindegewebes), Fibroadenom (gutartige Neubildung des periduktalen stromalen Bindegewebes und duktales Epithels) und intraduktales Papillom. Bei den bösartigen Erscheinungsformen unterscheidet man morphologisch *in situ*- und invasive Mammakarzinome. Die *in situ*-Karzinome dringen nicht in das umgebende Stroma ein. Dabei kann es sich um duktales *in situ*-Karzinome (Milchgangkarzinome) oder lobuläre *in situ*-Karzinome handeln, welche die intralobulären Ducti betreffen. Die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein invasives aus einem duktales *in situ*-Karzinom bildet, beträgt 30-50 % (durchschnittl. Entwicklungsdauer 12 Jahre), beim lobulären *in situ*-Karzinom hingegen nur 8 % innerhalb von 10 Jahren, bzw. 20% innerhalb von 35 Jahren.

Bei invasiven Karzinomen handelt es sich meist um duktales oder lobuläre Adenokarzinome. Das invasive duktales Karzinom ist der bei weitem häufigste maligne Brusttumor. Die Klassifizierung der Tumore erfolgt über das TNM-System*; histopathologische Untersuchungen (Schnellschnittverfahren) geben genaueren Aufschluß über eine etwaige Malignität.

* **TNM-System.** T steht für Tumordurchmesser, N für regionale Lymphknotenmetastasen und M für Fernmetastasen

Ein Ansatzpunkt, um die Geschehnisse bei der Metastasierung besser verstehen zu können, ist die Identifikation der Gene, die in der Brust beim Übergang von einem *in situ*-Karzinom zu einem invasiven Karzinom, überexprimiert werden. Doch nun stellt sich die Frage, auf welchem Wege diese Gene am umfassendsten identifiziert werden können, denn es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, veränderte Gentranskription oder -translation zu untersuchen.

Mit den Unterschieden auf Proteinebene beschäftigen sich zum Beispiel der differenzielle Antikörper-Screen, über den die Identifikation einer varianten Form des Oberflächenrezeptors CD44 gelungen war (Günthert *et al.*, 1991) und die subtraktive Immunisierung (Byrne & Cox, 1986; Williams, 1992). Die meisten Arbeiten, die sich mit der Isolierung von metastasierungsassoziierten Genen beschäftigten, wurden jedoch auf RNA- bzw. cDNA-Ebene vorgenommen. So gelang die Identifikation von mts-1 über eine *subtractive cloning*-Prozedur (Ebralidze *et al.*, 1989) und nm23 wurde durch differenzielles *library screening* isoliert (Steg *et al.*, 1988).

Inzwischen gibt es eine Reihe verschiedener Methoden, die den Vergleich zweier mRNA-Populationen erlauben, wie *Differential Display* (DD, Liang & Pardee, 1992; Sokolov & Prockop, 1994) und *Representational Differential Analysis* (RDA, Lisitsyn & Wigler, 1993). Untersuchungen unter Verwendung dieser Methoden führten bisher jedoch immer zu einer geringen Anzahl differenziell in der Tumorprogression exprimierter Gene (z.B. Gress *et al.*, 1997; Duncan *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998). Eine Ausnahme stellt die Hybridisierung von Ziel-cDNA auf Arrays, zur Identifikation relevanter Gene im Pankreaskarzinom dar (Gress *et al.*, 1996). Von Nachteil war jedoch, daß Gene, welche ausschließlich in dem zu untersuchenden System (Ziel-cDNA) exprimiert werden und daher nicht auf dem Array vorhanden sind, verloren gingen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle diese Methoden zu viele Nachteile, wie eine große Anzahl falsch positiver Gene, schlechte Reproduzierbarkeit und Isolierung nur weniger Gene, aufweisen, auch wenn die Identifikation einiger tumorrelevanter Gene gelang.

Neue Technologien erlauben umfassende Beschreibungen komplexer Veränderungen auf der Transkriptionsebene unter Identifikation niedrig abundanter Transkripte (SSH, *Suppressive Subtractive Hybridization*: Diatchenko *et al.*, 1996; SAGE, *Serial Analysis of Gene Expression*: Velculescu *et al.*, 1995). Die SSH-Technologie bietet gegenüber anderen alternativen Methoden der differenziellen Analyse zahlreiche Vorteile. Sie kombiniert eine hohe Subtraktionseffizienz mit einer angeglichenen Repräsentation (Normalisierungsschritt) von differenziell exprimierten Sequenzen und erlaubt daher eine exponentielle Amplifikation aller cDNAs gleichermaßen, unabhängig davon, ob sie in der Ausgangszelle stark oder nur schwach exprimiert werden. Der entscheidende Vorteil von SSH gegenüber allen anderen Methoden ist die Identifizierung seltener Transkripte. In

einem direkten Vergleich zwischen SSH und DDRT-PCR stellte sich die SSH als die schnellere und verlässlichere Methode für die Detektion differenziell exprimierter Gene heraus (Bertram *et al.*, 1998). SAGE stellt einen quantitativen Assay zur Identifikation des Expressionsprofils eines Systems dar. Es ermöglicht eine detaillierte Analyse tausender von Transkripten und ist somit ein ideales Mittel, Informationen über die Repräsentation von exprimierten Sequenzen eines Systems zu bekommen. Bei dieser Methode erhält man von jedem Transkript ein 13 bp langes cDNA-Fragment. 200 dieser Fragmente werden über spezifische Adaptoren miteinander verknüpft und anschließend an einem Stück sequenziert. Die Identifikation dieser Fragmente erfolgt schließlich mit Hilfe eines speziell entwickelten Computerprogrammes. War man durch Einsatz dieser Technik zum ersten Mal in der Lage, nahezu vollständige Aussagen über die Anzahl und Abundanz der exprimierten Gene eines Systems machen zu können, so liegt der Nachteil dieser Methode in der zweifelsfreien Zuordnung der kurzen Transkripte zu einem Gen und in experimentellen Beschränkungen. Andererseits ist die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils nur durch derart kurze Fragmente möglich, da pro cDNA-Expressionsbank ungefähr 40.000 Transkripte in Form dieser kurzen Fragmente sequenziert werden können.

Man sollte SAGE und SSH nicht als konkurrierende, sondern als ergänzende Techniken betrachten. Während SSH das ideale Mittel zur Differenzanalyse verkörpert, stellt SAGE die ideale Methode für die Bestimmung des Expressionsprofils in einem speziellen System dar und ermöglicht daher den Vergleich mit anderen Systemen.

Ziel dieser Arbeit

Die Anzahl und Identität der Gene, die in den metastatischen Prozeß involviert sind, ist noch weitgehend unbekannt. Für ein besseres Verständnis der Vorgänge, die sich bei der Entstehung eines invasiven Tumors aus einem lokalen abspielen, ist es aber notwendig, diese Gene zu identifizieren.

Über eine Differenzanalyse, mit der Veränderungen auf Expressionsebene untersucht werden können, sollen in dieser Arbeit metastasierungsspezifische Gene identifiziert werden. Eine Differenzanalyse ermöglicht den Vergleich der RNA-Populationen zweier Systeme, in diesem Fall eines metastasierenden mit einem nicht metastasierenden System. Die Untersuchung wird in einem Mammaadenokarzinom-System (13762NF) der Ratte durchgeführt, dessen metastatische Zelllinien *in vivo* ein analoges Metastasierungsverhalten zu menschlichem Brustkrebs zeigen (Neri *et al.*, 1981; North & Nicolson, 1985). Die Wahl

fällt auf ein Zellsystem, da sich ein Tumor aus einer heterogenen Zellpopulation zusammensetzt und isolierte cDNA-Fragmente sich daher nicht unbedingt auf spezifische Expression in den Tumorzellen zurückführen lassen. Auch im Hinblick auf weiterführende Expressions- und Funktionsstudien ist es sinnvoller, mit einem Zellsystem zu arbeiten. Die Suche nach differenziell exprimierten Genen in einer metastasierenden Zelllinie des 13762NF-Adenokarzinomsystems erfolgt mit einer Methode, die auch die Isolierung niedrig abundanter Transkripte ermöglicht, der SSH (*Subtractive Suppression Hybridization*, SSH, Diatchenko *et al.*, 1996).

Um zu bestimmen, in welchem Ausmaß Tumorzellen ein grundlegendes Set an Genen, welche bei Entwicklung und Progression des metastatischen Phänotyps exprimiert werden, gemein haben, soll die Expression ausgewählter Gene in verschiedenen Tumorphysionssystemen untersucht werden. Da diese Systeme aus Zelllinien verschiedener Gewebe der Ratte etabliert wurden, kann überdies festgestellt werden, ob die untersuchten Gene ausschließlich beim Mammakarzinom, oder auch in Karzinomen anderer Gewebe spezifisch exprimiert werden.

Bis zu diesem Punkt werden alle Studien in Rattensystemen durchgeführt. Von ganz besonderem Interesse ist jedoch die Identifizierung potentieller neuer Markergene in menschlichen invasiven Karzinomen. Die Identifikation solcher Markergene kann über Expressionsstudien ausgewählter Gene in operativ entfernten humanen invasiven Karzinomen erfolgen. Sollten tatsächlich derartige Markergene identifiziert werden können, so würde eine Untersuchung der Expression in einer Auswahl normaler Gewebe der Ratte zusätzliche Information bringen.

Material

1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe (p.a.) verwendet. Zur Herstellung von wäßrigen Lösungen wurde über eine Milli-QPlus-Anlage (Millipore) gereinigtes Wasser benutzt. Wäßrige Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Bezugsquellen der Chemikalien

Agarose	Biozym, Hameln
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, München
Chloroform (p.A.)	Merck, Darmstadt
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer Mannheim
DMEM	Gibco, Eggenstein
DMSO	Fluka, Buchs
DTT	BoehringerMannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Entellan®	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll	Sigma, München
FCS	Gibco, Eggenstein
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, München
G-50-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Sigma, München
HCl	Merck, Darmstadt
Hefe-t-RNA	Boehringer Mannheim

Material

Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Lysozym	Boehringer Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, München
MOPS	Roth, Karlsruhe
<i>Mounting medium</i>	Dako, USA
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oligo-dT-Zellulose	Pharmacia, Freiburg
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Bio Wittacker, Walkersville
Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS	Biorad, München
Streptomycin	Bio Wittacker, Walkersville
Tris-Base	Biorad, München
Trypsin	Difco, Detroit

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner (p.a.) Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2 Radiochemikalien

α -³²P-dCTP (370 MBq/ml)

α -³⁵S-dUTP (370 MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham, Braunschweig, bezogen.

3 Enzyme

Advantage™ KlenTaq Polymerase Mix	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
Eurobio-Taq Polymerase	Eurobio, Frankreich
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNase A	Sigma München
T4-DNA-Ligase	Sigma, München
Taq-Polymerase (Kolonie-PCR)	Promega, Heidelberg

Alle übrigen, nicht aufgeführten Enzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim, Promega (Heidelberg), Takkara (Japan, Vertrieb Heidelberg), Biolab (Frankfurt), Gibco (Karlsruhe) bezogen.

4 Kits

Easy-Pure	Biozym Diagnostik, Hameln
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Rediprime Kit</i>	Amersham, Braunschweig
CLONTECH PCR-Select™	
cDNA Subtraction Kit	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
RNA colour™ Kit	Amersham, Braunschweig
Themosequense™ Kit	Vistra Systems, Amersham, Braunschweig

5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech, bezogen. Die Sequenz für die bei der Kolony-PCR eingesetzten *Nested Primer* 1 und 2 wurde dem CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories) entnommen.

Adaptor und PCR-Primer für die Amplifikation des Drivers MTPa

<i>Eco-linker-Adaptor</i>	5'-TAG TCC GAA TTC AAG CAA GAG CAC A-3'
<i>Eco-linker-Primer</i>	5'-CTC TTG CTT GAA TTC GGA CTA-3'

PCR-Primer für die Gesamt-Längen-PCR der Zytokeratine

<i>forward Primer</i> Zytokeratin 7	5'-CGA GTG CGC GCT CCT CCT CGC -3'
<i>reverse Primer</i> Zytokeratin 7	5'-CGA GGA CTT CCG AAT AAG GTA GG-3'
<i>forward Primer</i> Zytokeratin 8	5'-GAA CCT CCG TCT TCA GCT CAC TGC -3'
<i>reverse Primer</i> Zytokeratin 8	5'-GGT TGA GTT AAC ATA AAA GGT T-3'
<i>forward Primer</i> Zytokeratin 19	5'-CAT GAC TTC CTA CAG CTA TCG -3'
<i>reverse Primer</i> Zytokeratin 19	5'-CGA GAA GAG GAC TGG ACG GTT A -3'

Sequenzierungsprimer

<i>forward Primer Texas red</i>	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'
<i>reverse Primer Texas red</i>	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

6 Plasmide

TA-Vektor pCRII.1	Invitrogen, Niederlande
TA-Vektor pGEM® -T Easy	Promega, Heidelberg

7 Bakterien

DH5a	Genotyp: F ⁻ , ϕ 80d lacZ Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> <i>deoR</i> , Δ (lacZYA-argF)U169
ELEKTROMAX (DH10B)	Genotyp: F ⁻ ; <i>mcrA</i> ϕ 80d lacZ Δ M15, Δ lac X74 <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD</i> , 139 Δ 7697, <i>gal/U</i> <i>gal</i> Kh ⁻ <i>rps</i> L, <i>nupG</i> Gibco, Eggenstein

8 Zelllinien

8.1 Ratten-Zelllinien

13762NF-System:	Zelllinien aus einem Brustadenokarzinom-System der Ratte MTPa, MTC, MTLN-2, MTLN-3, MTLY (Neri et al., 1982) Kulturmedium: 90 % DMEM, 10 % FCS
BSp73-System:	Zelllinien aus einem Pankreaskarzinomsystem der Ratte 1AS, 10 AS, ASML (Matzku et al., 1983) Kulturmedium: RPMI 1640, 10 % FCS
Prostata-System:	Zelllinien aus einem Prostatatumorsystem der Ratte G-Sublinie, AT-1, AT-3, MatLu, MatLyLu (Isaacs et al., 1986) Kulturmedium: RPMI 1640, 10 % FCS
Kim-Zelllinien:	Brusttumorzelllinien der Ratte NM081/MT450 (Kim, 1986) Kulturmedium: 90 % DMEM, 10 % FCS

8.2 humane Zelllinien

MDA-MB 231:	kloniert nach pleuraler Effusion aus einem epithelialen Adenokarzinom der Brust einer 51jährigen Patientin (Cailleau et al., 1974) <i>in vivo</i> -Test: invasiv in Nacktmäusen, bildet schwach differenziertes Adenokarzinom dritten Grades aus. ATCC-Nr. HTB-26, Kulturmedium: 95 % DMEM, 5 % FCS
-------------	--

MDA-MB 468 : kloniert aus einem epithelialen Adenokarzinom der Brust einer 51jährigen Patientin (Cailleau et al., 1978)
in vivo-Test: tumorigen in Nacktmäusen
ATCC-Nr. HTB-132,
Kulturmedium: 95 % DMEM, 5 % FCS

9 RNA-Membran

Für die *Northern-Blot*-Analyse mit S7 wurden RNA-Membranen von Invitrogen, Niederlande, eingesetzt (*Northern TerritoryTM-Human Colon Tumor Blot*, D 5050-01, Lot-Nr. 607339; *Northern TerritoryTM-Human Breast Tumor Blot*, D 5040-01, Lot-Nr. 607338)

10 Geräte und Verbrauchsmaterial

Axioskop Mikroskop	Zeiss, Jena
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Deckgläser	Bender & Hobein, Bruchsal
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt
Einbettformen	Reichert & Jung, Nußloch
Einmalzellschaber	Costar
Einmalspritzen, steril	Becton Dickinson, Braunschweig
Entwicklermaschine f. Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Glaswolle	Merck, Darmstadt
Histowax	Leica, Bensheim
Hyperfilm XR®	Amersham, Braunschweig
Hybond N ⁺	Amersham, Braunschweig
Injektionskanülen, steril	Rose, Trier
Kühlzentrifuge Kontron-Hermle Cen.	Hermle, Gosheim
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Mikrotom	Reichert & Jung, Nußloch
Objekträger	Bender & Hobein, Bruchsal
Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Röntgenfilmkassetten	Dupont
Spektralphotometer	Zeiss, Jena
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator (IL-350 M)	Bachofer, Reutlingen
Vakuum-Kondensator (Speed Vac)	Salvant, Farmingdale
Vapoklav, Dampfsterilisator	Sterico AG, Dieticon
Whatman 3MM-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen

11 Bioinformatik

11.1 Datenbanken

NCBI, einschließlich aller nicht-redundanten Genbanken:
GenBank+EMBL+DDBJ+PDB-Sequenzen, sowie den DDBJ EST-*Division*

11.2 Programme

Automatische Erkennung und Entfernung von Adaptorsequenzen (von Dr. W-G. Thies, IGT, programmiert)

Blast 2 sequences (NCBI, Tatusova et al., 1999)

Blastn sequence similarity search (NCBI, Altschul et al., 1997)

PUBmed (NCBI)

Methoden

1 Analyse von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die Extinktion der wässrigen Nukleinsäure wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml (doppelsträngiger) DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml Oligonukleotid.

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur Abtrennung von Enzymen und anderer Proteine mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Zur nukleinsäurehaltigen wässrigen Lösung wurde Phenol im gleichen Volumen gegeben und gut geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren (Tischzentrifuge, 10.000xg, 2 min, RT) wurde die obere wässrige Phase entnommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) vermischt. Durch erneutes Trennen der Phasen mittels Zentrifugation konnte die obere, wässrige Phase zur weiteren Verwendung isoliert werden.

Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Zu der nukleinsäurehaltigen Lösung wurde 3M Natriumacetat (pH 4,8) gegeben und auf eine Konzentration von 0,25-0,3 M eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol erfolgte die Präzipitation für mindestens 30 min bei -20°C oder für mindestens 10 min bei -80°C. Das Präzipitat wurde anschließend bei 10.000xg 20 min lang zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmal für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Niederschlag ebenfalls bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2 DNA-Methoden

2.1 DNA-Präparation

Plasmid-DNA Mini-Präparation

Die Bakterienklone, deren Plasmid isoliert werden sollte, wurden mit einer Pipettenspitze von einer Selektiv-Agarplatte gepickt und in 3 ml LB-Medium, dem 100 mg/ml Ampicillin zugesetzt worden war, über Nacht bei 37°C geschüttelt.

1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden zur DNA-Isolierung eingesetzt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4.000xg (Tischzentrifuge, RT) wurden die sedimentierten Bakterien in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Denaturierungspuffer hinzugegeben, 150 µl 3 M NaAcetat, pH 4,8 hinzugefügt, wobei Proteine und die „chromosomale“ DNA ausfallen. Daraufhin wurde der Ansatz zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15 min RT, 10.000xg) und der klare Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die Plasmid-DNA präzipitiert und durch 10minütige Zentrifugation bei 10.000xg sedimentiert. Nach dem Waschen mit 80% Ethanol wurde die Plasmid-DNA luftgetrocknet und in 30 µl Wasser gelöst.

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 g/ml RNase A

Denaturierungspuffer: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

Plasmid-DNA Maxi-Präparation

Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte gemäß Protokoll der Firma Qiagen (Ionenaustauscher-Säulenchromatographie). Bakterienklone, deren Plasmid isoliert werden sollte, wurden mit einer Pipettenspitze von einer Selektiv-Agarplatte gepickt oder einer getesteten Mini-Kultur entnommen und in 200 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation bei 4.000xg für 10 min wurden die Bakterien pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml Puffer P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml Puffer P3 neutralisiert (10 min, RT), bei 4°C und bei 2.000xg 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Qiagen-tip-500-Säulen (Qiagen Inc.) laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA aus der Säule, wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei

Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, luft-getrocknet und anschließend in 500µl Wasser gelöst.

Puffer P1: 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 g/ml RNase A

Puffer P2: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

Puffer P3: 3 M NaAcetat, pH 4,8

2.2 Klonierungstechniken

Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe einer 10x konzentrierten Puffer/Salz-Lösung das für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimale Milieu, entsprechend den Angaben des Herstellers, eingestellt. Je mg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease hinzugegeben. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug dabei mindestens das 10fache des Volumens der zugesetzten Enzymlösung. Die Reaktion wurde bei 37°C (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) und mindestens für 2 h durchgeführt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zu inserierendes Fragment wurde im Verhältnis 1:1 oder 2:1 zum Vektor gegeben. Mit je 2 Einheiten T4-DNA-Ligase wurde in einem Endvolumen von 20 µl Ligationspuffer über Nacht bei 15°C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden 2 µl des Ligationansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

Ligationspuffer: 50 mM Tris, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 5 mM ATP

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Dies sei eine Standardbeschreibung. Auf Details der verschiedenen PCR-Anwendungen dieser Arbeit wird dann entsprechend bei den einzelnen Methoden und Versuchen eingegangen.

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte und folgenden Bedingungen in der entsprechenden PCR-Maschine (s. jeweiligen Versuch): 1/10 Volumen 10x PCR Puffer, 1/10 Volumen 10xdNTP-Lösung, je 1/10 10x Primer (2,5mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

10xPCR-Puffer: 500 mM KCl, 100 mM Tris, pH 8,4; 15mM MgCl₂

10xdNTP-Lösung: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, pH 7,0

Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Für die Erststrangsynthese wurden 1 µg polyA⁺RNA mit 200 ng Oligo-(dT)₂₀-Primer in einem Volumen von 12 µl bei 70°C für 10 min inkubiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrang-Puffer (Gibco BRL), 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP's und 1 µl (200 U) SUPERSCRIPTTMII(Gibco BRL)-Reverser Transkriptase wurde bei 42°C im Umluftofen 1,5 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 72°C inaktiviert.

Zweitstrang-cDNA-Synthese

Im Anschluß an die Erststrang- erfolgt die Zweitstrangsynthese im gleichen Reagenzgefäß. Es werden hinzugefügt und vorsichtig gemischt: 92 µl steriles Wasser, 32 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl *E.coli* DNA-Ligase (7,5 U/µl), 4 µl *E.coli* DNA-Polymerase I (10 U/µl) und 1 µl *E.coli* RNase H (1 U/µl). Nach Inkubation bei 16°C für 2 Stunden wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion und in Gegenwart von 10 µg Glykogen eine Alkoholfällung vorgenommen und nach Präzipitation in Wasser aufgenommen.

Zweitstrangpuffer: 94 mM Tris-HCl pH 6,9, 453 mM KCl, 23 mM MgCl₂,
750 μM β-NAD, 50 mM (NH₄)₂SO₄

Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des TMVistra DNA-Sequenzierers 725 vorgenommen. Hierfür wurde ein Kit benutzt (*Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit*, Amersham), zusammen mit den entsprechenden mit Texasrot markierten Primern. Alle Reagenzien wurden dem Kit entnommen und entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Thermozyklusbedingungen für die Sequenzierreaktion waren wie folgt: 94°C - 1 min, dann 22 Zyklen: 94°C - 30 s, 50°C - 15 sec, 72°C - 30 sec. Danach wurden 3 μl Ladefarbpuffer zu jeder Reaktion hinzugefügt und das Volumen mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingengt (bis auf 3-4 μl). Nachdem das Gel in der Sequenziermaschine für 30 min vorgelaufen war, wurde es beladen und über Nacht laufen gelassen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch die des TMVistra DNA-Sequenzierers 725 - Software.

Präparation elektrokompenter Bakterien

Eine einzelne Kolonie des *E.coli* Stammes DH5a wurde verwendet, um 1 ml SOB-Medium anzupflanzen. Die Kultur wurde im Schüttler bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Dies wurde benutzt, um wiederum 300 ml SOB-Medium anzupflanzen. Die Bakterien wurden bei 18-20°C wachsen gelassen, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,5 erreicht war. Wenn dies erreicht war, wurde die ganze Kultur für 5 min bei 37°C inkubiert ("Hitzeschock"), bevor die Bakterien für weitere 20 min 18-20°C ausgesetzt wurden. Zur Salzentfernung wurde die folgende Prozedur 4-5 mal wiederholt: Sedimentation bei 3.600xg für 10 min, Resuspension des Pellets in 50 ml eiskalten Wassers. Schließlich wurden die Zellen in 800 μl eiskaltem Wasser aufgenommen, welches 7 % DMSO enthielt. Aliquots von je 40 μl wurden bei -80°C gelagert.

Elektrotransformation von Bakterien

1 μl eines Ligationsansatzes wurde zu 40 μl elektrokompetenten *E.coli* DH5a-Zellen hinzugefügt und eine Minute auf Eis inkubiert. Danach wurde die Mischung in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm Spaltbreite, BioRad) überführt und mit 1,8 Kv (Gene Pulser, BioRad) transformiert. Sofort danach wurde 1 ml SOC-Medium hinzugefügt und das Ganze in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde 50-100 μl auf einer Ampicillin-Selektiv-Agar-Platte ausplattiert.

SOB-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt, 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
 20 mM Glukose

Herstellung von Selektiv-Agarplatten

Zu 1 l frisch angesetzttem LB-Medium wurde 1,5% (w/v) Bacto-Agar hinzugegeben. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 45°C erfolgte die Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 mg/ml. Diese Menge ist zum Gießen von ca. 25 Agarplatten (9 cm Durchmesser) ausreichend. Durch Überstreichen der Platten mit einer Bunsenbrennerflamme können Luftblasen entfernt werden. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bis zu ihrer Verwendung bei 4°C für maximal 6 Wochen gelagert.

Einfrieren von Bakterien

Einer Bakterienkultur, welche 12 Stunden bei 37°C unter Schütteln gewachsen war, wurden 900 μl entnommen, mit 100 μl DMSO vermischt und bei -80°C aufbewahrt, ebenso wurden die Bakterienklone, die je einen Vektor mit einem differentiell exprimierten Gen trugen, stets im Verhältnis 90% LB-Medium und 10% DMSO bei -80°C eingefroren.

2.3 DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Horizontalgelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5%-ige Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1xTAE gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugaben von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1xTAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100V (35-45mA). Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht (interkalarischer Einbau von Ethidiumbromid in die DNA) und zur Dokumentation fotografiert.

Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,1% SDS, 0,02 % Bromphenolblau

DNA-Isolation aus Agarose-Gelen

Nach Identifizierung der zu isolierenden DNA-Bande unter UV-Licht, wurde diese mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit dem dreifachen Volumen SALT-Puffer (EASYPURE DNA Purifikation Kit, Biozyme) versetzt und für 10 min bei 55°C geschmolzen. Durch Zugabe von BIND (5µl+1µl/µg DNA) und 5 minütiger Inkubation bei RT unter häufigem Mischen, wurde die DNA gebunden. Nach 5 s Zentrifugation wurde das Sediment in 1 ml WASH resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 s wurde der Überstand verworfen und nochmals zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde entfernt, das Sediment getrocknet und mit einer geeigneten Menge (20-30 µl) deionisierten autoklaviertem Wasser resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde 1 min bei 10.000xg zentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch eine weitere Zentrifugation konnten Reste von BIND entfernt werden. Die DNA-Lösung wurde photometrisch gemessen und bei -20°C gelagert.

3 RNA-Methoden

Präparation von poly(A)⁺ RNA aus Zellen

Zur Präparation von poly(A)⁺ RNA aus Zellen wurden je 2×10^6 Zellen auf einer 15 cm-Kulturschale ausgesät und bei ca. 80-90%iger Dichte geerntet. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 10 ml sterilem STE/SDS abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA der Zellen wurde mit Hilfe eines *Ultra-Turax*TM-Homogenisators (Janke & Kunker GmbH & CoKG) für 30 s geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die NaCl-Konzentration auf 0,5 M eingestellt wurde, wurde pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB zugegeben. Unter ständigem Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur konnte die poly(A)⁺ RNA an die Oligo-dT-Zellulose binden. Die Oligo-dT-zellulose wurde durch wiederholtes Zentrifugieren für 2 min bei 1.000xg dreimal mit HSB gewaschen. Die Elution der poly(A)⁺ RNA erfolgte durch wiederholtes Zentrifugieren (dreimal mit 1 ml und einmal mit 0,5 ml H₂O). Zur vollständigen Entfernung der Oligo-dT-Zellulose wurden die in 3,5 H₂O ml eluierte poly(A)⁺ RNA nochmals für 5 min bei 2.000xg abzentrifugiert. Die Konzentration der poly(A)⁺ RNA wurde mit 500 µl des Eluats spektralphotometrisch bestimmt. In den verbleibenden 3 ml RNA -Lösung wurde die NaAc-Endkonzentration mit 3 M NaAc, pH 4,8 auf 0,2 M eingestellt und zusammen mit Hefe-tRNA (1µg/µl) als Fällungshilfe und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA bei 10.000xg und 4°C für 30 min zentrifugiert, das Sediment an der Luft getrocknet und in H₂O resuspendiert. Die RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄,
1,5 mM KH₂PO₄

STE/SDS: 20 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS,
300 g/ml Proteinase K

HSB: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS

Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Ein kleines Gewebestück (frisch oder gefroren) wurde in 8 ml Lösung D gegeben. Nach dem Homogenisieren der Probe (Ultraturax, 1 min) wurden nacheinander 2 ml 4 M Natriumacetat, pH 4,0; 8 ml Phenol (wassergesättigt) und 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol

(49:1) zugegeben. Nach jedem Pipettierschritt wurden die Phasen kräftig auf dem Vortex-Schüttler durchgemischt. Nach diesen Schritten wurde das Röhrchen für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 10.000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde nochmals mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert. Bei Lipidreichen Geweben wurde der Extraktionsschritt noch ein weiteres Mal wiederholt. Die RNA wurde dann anschließend durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 10.000xg) wurde das Präzipitat sedimentiert und das Pellet anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde es wiederum in Lösung D aufgenommen und die gelöste RNA durch Zugabe von 1 Volumen Iso-Propanol ein zweites Mal gefällt. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitats wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Gesamt-RNA wurde dann sterilem Wasser aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

Lösung D: 4M Guanidiniumisothiocyanat, 100 mM Tris pH 8,0; 100 mM β -Mercaptoethanol,
0,5 % Sarkosyl

Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen. Ein Gramm Agarose wurde mit 79 ml H₂O und 5 ml 20x MOPS-Puffer zum Lösen der Agarose gekocht. Nach Abkühlen auf 60°C und Hinzufügen 16 ml 37%igen Formaldehyds wurde das Gel in eine horizontale Gelapparatur gegossen, wobei mit Hilfe eines Kammes Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart wurden. Nach Polymerisation des Gels wurde es mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die RNA-Lösung wurde mit einem Volumen Formamid-Denaturierungspuffer versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert, auf Eis gekühlt, mit 1/6 Volumen 6x Glycerin-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 Volt für etwa 2 Stunden. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Bestrahlung photographiert.

MOPS-Puffer: 20 mM MOPS, 5mM NaAc, 0,5 mM EDTA pH 7,0
Formamid-Denaturierungspuffer: 35 μ l Formaldehyd (37%), 1 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml),
10 μ l 20x MOPS, 100 μ l deionisiertes Formamid, 54 μ l H₂O

4 Transfer- und Hybridisierungstechniken

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten nach der "*Random-Priming*"-Methode

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des Rediprime-Kits (Amersham) gemäß den Herstellerangaben. 20-100 ng der gereinigten DNA-Sonde wurden in deion. Wasser (Endvolumen 50 µl) 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis kurz abgekühlt. Die denaturierte DNA-Lösung wurde in die von Amersham vorbereiteten Eppendorfgefäße pipettiert und gemischt (die Eppendorfgefäße enthalten dNTPs (außer dCTP), *Klenow*-DNA-Polymerase, *Random-Primer* und den Reaktionspuffer). Dann wurden 3 µl [α -³²P] dCTP zugegeben und bei 37°C 10-30 min inkubiert. Hierbei findet ausgehend von den Primern die Synthese des neuen Doppelstranges statt, welcher durch den Einbau des [α -³²P] dCTP radioaktiv markiert ist. Nachdem das Volumen mit TE auf 400 µl erhöht wurde, lassen sich mittels nachfolgender Gelfiltration (G-50-Sepharose) sich nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide entfernen.

TE: 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH8

Northern-Blot-Verfahren

Um ein vollständiges Übertragen der RNA aus dem Gel auf die Membran zu gewährleisten, ist es notwendig, das Formaldehyd durch 30minütige Inkubation des Gels in 5xSSC zu entfernen. Der Transfer von aufgetrennter RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylommembran (Hybond N⁺ Amersham) erfolgte durch Kapillarkräfte. Hierzu wurden in einer Wanne mit 20x SSC drei Lagen *Whatman 3MM*-Papier auf einer Glasplatte so angeordnet, daß die Enden der Papierlagen in den SSC-Puffer getaucht waren. Darauf wurde das Gel gelegt, auf das Gel luftblasenfrei die Nylonmembran und auf diese wiederum drei Gelstück-große Lagen *Whatman 3MM*-Papier. Diese Anordnung wurde mit einem Stapel Zellstoff überschichtet und einem Gewicht beschwert, sodaß durch die Kapillarkräfte die Flüssigkeit nach oben gesaugt und dadurch die RNA auf die Membran übertragen wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach beendetem Transfer wurde auf der Membran die Position der Probenaschen, sowie der 28S und 18S ribosomalen RNA markiert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht für 35 s in einem *Stratalinker 2.400* (Stratagene) wurde die RNA kovalent an die Membran fixiert.

20x SSC: 3M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7

Southern-Blot-Verfahren

Zum Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen wurde die Kapillarblottechnik angewandt, wie sie bereits beim *Northern-Blot*-Verfahren beschrieben wurde. Vor dem Transfer wurde das Gel für 30 min in 0,4 M NaOH inkubiert, um eine Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Der Transfer selbst erfolgt ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺ Amersham). Im Anschluß wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und bis zur Hybridisierung trocken bei RT aufbewahrt.

Radioaktive Hybridisierung des *Northern-* oder *Southern -Blots*

Zur Detektion einer bestimmten RNA bzw. wurde die Membran mit einem für die mRNA spezifischen radioaktiv markierten DNA-Fragment hybridisiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Vorhybridisierung der Membran in einem Glasrohr für 2 h im Hybridisierungssofen bei 65°C mit 5-10 ml Church-Hybridisierungspuffer. Danach wurde die radioaktiv markierte Sonde, welche zuvor für 10 min bei 95°C denaturiert worden war, hinzugefügt und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran bei 65°C je zweimal und 30 min mit 2x SSC/0,1% SDS und 1x SSC/0,1% SDS gewaschen, in Folie eingeschweißt und je nach zu erwartendem Signal entweder bei Raumtemperatur oder mit einer Verstärkerfolie bei -80°C mit einem Röntgenfilm exponiert. Handelt es sich um eine Kreuzhybridisierungsreaktion zwischen zwei Spezies wird eine niedrigere Temperatur von 49 - 55 °C für Hybridisierung und Waschschrte gewählt. Bevor die Membran für eine weitere Hybridisierung mit einer anderen Sonde verwendet werden konnte, wurde die ursprüngliche Sonde durch Kochen der Membran in 0,2 % SDS für eine Minute und nachfolgendes Abkühlen auf dem Schüttler, entfernt (2-3mal wiederholen und zwischendurch eventuell noch hybridisierte Sonden mit dem Geigerzähler ausmessen) und eingeschweißt.

Church-Hybridisierungspuffer: 1mM EDTA; 0,5M NaHPO₄, pH 7,2; 7% SDS

5 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 6% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Behandlungen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C; 1,4 bar; 20 min). Alle verwendeten Zellen entweder in DMEM oder RPMI mit 10% FCS kultiviert.

Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS (37°C) gewaschen und für einige Minuten mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen auf -80°C abgekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden sie in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

Einfriermedium: DMEM + 20 % FCS + 10 % DMSO

6 Histologische Techniken

Fixierung von Geweben

Entnommene Organe oder Gewebeproben wurden zunächst in PBS gewaschen, sodann wurden sie in frischer Fixierlösung über Nacht fixiert, bevor sie wieder gewaschen, eventuell entkalkt und dann entwässert wurden. Die Entkalkung erfolgte in Morse's Reagenz für 2-4 Tage. Entwässert wurden die Organe und Gewebe über eine Standard-Alkoholreihe, je nach Organgröße für 1-5 Stunden/Schritt, zur längeren Aufbewahrung wurden die Proben in 70% Ethanol gelagert.

Fixierlösung: 4 % Paraformaldehyd in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Morse's Reagenz: 10 % Natriumcitrat; 22,5 % Ameisensäure

Einbettung in Paraffin

Die entwässerten Gewebe wurden aus dem 100% Ethanol zunächst zweimal für je 1 Stunde in Aceton überführt, bevor sie dann für 2 Stunden in Xylol und weiter für 3 Stunden in Xylol:Histowax (1:1, 59°C) überführt wurden. Schließlich wurden sie für mindestens 3 Stunden in Histowax (59°C) inkubiert. Die Gewebe wurden sodann in vorgewärmte Einbettungsförmchen überführt, mit frischem Histowax (60°C) übergossen und auf Eis schnell abgekühlt. Nach Entnahme aus den Einbettförmchen wurden sie bis zum Schneiden bei 4°C gelagert. Es wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 6µM zugeschnitten und bei 50°C im Wasserbad auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Markierung von RNA durch *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde der entsprechende Vektor mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Durch die Wahl des jeweiligen Restriktionsenzym und die Verwendung von T7- bzw. SP6 oder T3-Phagen-RNA-Polymerase war es möglich, sowohl "*antisense*", wie auch "*sense*" Transkripte herzustellen. Nachdem das Plasmid mit dem jeweiligen Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die Enden der Schnittstellen aufgefüllt, um eine unspezifische Initiation der Transkription an etwaigen

überhängenden 3'-Enden zu verhindern. Sodann wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA ausgefällt. Nach dem Waschen und Trocknen wurde das linearisierte Plasmid in ddH₂O in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

Je nachdem, ob die Markierung über radioaktiv- oder fluoreszenz-markierte Nukleotide erfolgte, wurde nach dem entsprechenden weiterführenden Protokoll verfahren.

Radioaktive Markierung von RNA durch *in vitro*-Transkription

Danach wurde der Transkriptionsansatz zusammengemischt. In einem Volumen von 20 µl wurden 10 µg DNA mit 2 µl 10x TSC-Puffer, 2U RNAsin, 4 µl 100 mM DTT, 625 µM rNTPs (ohne UTP, 50 mCi α-³⁵S-UTP und 30 U Phagen-RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6) inkubiert. Anschließend wurde dem Transkriptionsansatz 5-10 µg t-RNA und 3U RNase-freie DNase hinzugefügt und die Plasmid-DNA für 15 min bei 37°C verdaut. Die Hydrolyse in kürzere Fragmente erfolgt wie bei der nicht radioaktiven Markierung beschrieben. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Zur Entfernung nicht eingebauter Radioaktivität wurde die RNA zweimal mit 2 M NH₄Cl und 2,5 Volumina Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 10.000xg) wurde das Pellet getrocknet und in 53 µl 100 mM DTT aufgenommen. Ein 1 µl Aliquot wurde im Szintillationszähler gemessen. Die restliche Probe wurde wieder in 2M NH₄Cl aufgenommen, mit 2,5 Volumina Ethanol versetzt und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

10x TSC-Puffer: 0,4 M Tris pH 8; 100 mM MgCl₂; 200mM DTT; 100mM NaCl;
40 mM Spermidin; 0,5 mg/ml BSA

Nicht radioaktive Markierung von RNA durch *In-vitro*-Transkription

Die nicht radioaktive Markierung wurde mit Hilfe des Kits *RNA colour kit* (Amersham, Life Science) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Der Transkriptionsansatz wurde folgendermaßen gemischt. In einem Volumen von 20 µl wurden 1 µg linearisierte DNA mit 4 µl Transkriptions-Puffer, 20 U HPRI, 1 µl 200 mM DTT, 8 µl rNTPs (incl. *fluorescein*-11-UTP) und 20 U Phagen-RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6) inkubiert für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Plasmidverdau werden 10 U RNase-freie DNase in 80µl sterilem Wasser zur markierten Probe hinzugefügt und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Um die optimale Länge für ISH-Fragmente zu erhalten, wurde ein Hydrolyseschritt vorgenommen. Die Inkubationszeit richtet sich nach der gewünschten Länge der Fragmente (hier 0,15 kb) entsprechend der Formel:

$$t \text{ (min)} = \frac{L_o - L_f}{k \cdot L_o \cdot L_f}$$

L_o = ursprüngliche Transkriptlänge in kb
 L_f = gewünschte (*final*) Transkriptionslänge in kb
 k = 0,11 Schnitte/kb/min

Nach der Hydrolyse wird 1.3 µl Eisessig, 20 µl 3 M NaAc, pH 5,2 und 500 µl Ethanol und 10 µg Glykogen hinzugefügt und für mindestens 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 10.000xg und Waschen mit 70% Ethanol kann die in sterilem Wasser aufgenommene (gelb fluoreszierende RNA) bei -80°C gelagert werden.

In-Situ-Hybridisierung

Alle Arbeiten erfolgten unter RNase-freien Bedingungen. Die Gewebeschnitte wurden durch Inkubation für zweimal 10 min in Xylol entwacht. Durch die absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 30% Ethanol, H₂O, je 2 min) wurden die Gewebe rehydriert. Nach zwei Waschschritten in PBS und 0,83% (w/v) NaCl für je 5 min wurden die Schnitte 20 min in Fixierlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS (zweimal 5 min) wurden die Proteine im Gewebe mit Proteinase K (Endkonzentration 10 mg/ml in 20 mM Tris PH 7,4; 1 mM EDTA) verdaut. Erneut wurde für 5 min mit PBS gewaschen und die Gewebe für weitere 5 min in Fixierlösung inkubiert. Nach 5 min Waschen in PBS wurden positive Ladungen durch Inkubation (10 min) in Blockierungspuffer neutralisiert und damit unspezifische Bindungsstellen gesättigt. Nach erneutem Waschen für 5 min in PBS wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (s. o.) dehydriert und anschließend bei RT getrocknet.

Je nachdem, ob die Markierung über radioaktiv- oder fluoreszenz-markierte Nukleotide erfolgte, wurde nach dem entsprechenden weiterführenden Protokoll verfahren.

Fixierlösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Blockierungspuffer: 1,25 % (v/v) Triethanolamin; 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid

Radioaktive *In-Situ*-Hybridisierungsreaktion (ISH)

Die radioaktive *In-Situ*-Hybridisierung wurde nach dem Verfahren von Wilkinson und Green (1990) durchgeführt. Die in Ethanol aufbewahrte radioaktive RNA-Probe wurden pelletiert (Tischzentrifuge, 10.000xg, 10 min), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Die RNA-Probe wurde 5 min bei 80°C denaturiert, anschließend in Hybridisierungspuffer aufgenommen und je 120 µl ($1,5 \times 10^5$ cpm/ml Hybridisierungslösung) auf einen vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig aufgebracht und mit silianisierten Deckgläschen abgedeckt. Zur Hybridisierung wurde eine Glasschale mit 3 Lagen in 2x SSC getränktem 3MM-Whatman-Papier und einer Aluminiumfolie ausgelegt. Die Objektträger wurden in die Glasschale gelegt, die mit einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 59°C im Wasserbad inkubiert wurde.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte mit 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol (einmal 15 min bei 37°C, einmal 30 min bei 65°C, einmal 2-6 h bei 37°C) gewaschen. Danach wurden die Schnitte einmal 15 min bei 37°C in NTE inkubiert. Zur Entfernung einzelsträngiger RNA wurden die Gewebeschnitte für 15 min bei 37°C in NTE mit RNaseH (Endkonzentration 20 mg/ml) inkubiert. Nach erneutem Waschen in NTE (15 min bei 37°C) folgte ein weiterer Waschschrift in 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol (30 min bei 37°C).

Abschließend wurden die Schnitte bei RT in 2xSSC (einmal 15 min) und 0,1x SSC (15 min) gewaschen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) wurden die Gewebe entwässert. Die Objektträger wurden bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in der Dunkelkammer durch Eintauchen in eine 42°C warme, flüssige Photoemulsion (LM-1 Photoemulsion mit H₂O 1:1 verdünnt) beschichtet und im Dunkeln getrocknet. Die Objektträger wurden lichtdicht verpackt und bei 4°C für eine Woche exponiert. Dann wurde die Photoemulsion entwickelt (16% KodakD-19 Entwickler, 3 min), fixiert (Eisessig 1 min, 30 % Natriumthiosulfat, 3 min), und gewässert (Leitungswasser zweimal 10 min und einmal 30 min). Die Objektträger wurden getrocknet und die Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmittel Entellan eingebettet und lichtmikroskopisch ausgewertet.

NTE:	0, 5 M NaCl; 10 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA
Hybridisierungspuffer:	1x Hybridisierungssalz, 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 10 mM DTT, 0,01 mg/ml tRNA
10x Hybridisierungssalz:	0,2 % PVP, 0,2% Ficoll, 0,38 % NaH ₂ PO ₄ , 50 mM EDTA, 3 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8
20x SSC:	3M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7

Nicht radioaktive *In-Situ*-Hybridisierungsreaktion (FISH)

Die nicht radioaktive *In-Situ*-Hybridisierung wurde mit Hilfe des Kits *RNA colour kit* (Amersham, Life Science) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Nach Erwärmen der Hybridisierungslösung auf 37°C wird diese 1 : 1 mit deionisiertem Formamid gemischt. Nun wird die markierte Probe in einer Konzentration von 300-600 ng/ml zum auf 55°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer-Gemisch gegeben und 50-100 µl pro Schnitt aufgetragen und über Nacht bei 55°C hybridisiert. Der Aufbau der Hybridisierungsbox erfolgt wie der der radioaktiven ISH beschrieben. Am nächsten Tag wird mit 1x SSC/ 0,1% (v/v) SDS für 2x5 min bei RT gewaschen, gefolgt einem zweiten Waschschrift in 0,2x SSC/ 0,1% (v/v) SDS für 2x5 min bei 55°C. Nach Waschen der Objektträger in TBS für 5 min, werden sie für eine Stunde in Blockierungslösung (0,5 % (w/ v) Blockierungsagens, Amersham in TBS) inkubiert und wiederum für eine min in TBS gewaschen. Nun wird der Antikörper 1:1.000 (in 0,5% (w/v) *BSA fraction V* in TBS) verdünnt, 100 µl pro Schnitt aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Danach werden die Objektträger in Detektionspuffer gewaschen, abtropfen gelassen und mit dem Detektionsreagenz (45 µl NBT und 35 µl BCIP zu 10 ml Detektionspuffer) versetzt. Auf jeden Schnitt wird 500 µl aufgetragen und im Dunkeln für 4-24 Stunden exponiert. Nach ausreichender Exposition werden die Objektträger für 2x2 min in Wasser getaucht, gegengefärbt, mit wasserlöslichem Eindeckelmedium eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

20x SSC: 3M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7

TBS: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 400 mM NaCl

Detektionspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

7 Differenzielle Subtraktion

Herstellung einer subtrahierten Bank mittels SSH

Die Subtraktionsreaktion erfolgte mit Hilfe des Kits CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) gemäß den Herstellerangaben, allerdings mit einigen Veränderungen. Ausgenommen mit den hier angezeigten Veränderungen und Ergänzungen wurde wie im Standardprotokoll verfahren. Allerdings hat sich die vorgeschlagene Ligationskontrolle (*Analysis of Ligation*) als unzuverlässig und auch überflüssig gezeigt, da im übrigen eine nachfolgende PCR nur bei erfolgreicher Ligation erfolgen kann. Das Prinzip sei im Ergebnisteil anhand des untersuchten Systems erklärt. Alle PCR- und Hybridisierungsschritte wurden in einem Perkin-Elmer 2400 Thermozykler vorgenommen. Die PCR-Schritte wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen Advantage™ KlenTaq Polymerase Mix nach den im Handbuch vorgegeben Bedingungen durchgeführt. Die Polymerase besitzt *proofreading*-Aktivität und das Mix enthält einen TaqStart™-Antikörper (Kellogg et al., 1994).

Abänderung des Protokolls: 2. Hybridisierungsrunde

In der zweiten Hybridisierungsrunde wurde eine erhöhte Driverkonzentration zugegeben, um die Subtraktion effizienter zu machen. Ein Nachteil könnte sein, daß dadurch Transkripte, die nur 2-3fach hochreguliert sind, raussubtrahiert werden. Veränderte Zusammensetzung der Driver-Zugabe:

Driver cDNA (<i>RsaI</i> -verdaut)	1,5 µl
4x Hybridisierungspuffer	1 µl
Steriles Wasser	1,5 µl

Statt wie vorgeschrieben aus diesem, mit Mineralöl beschichteten Gemisch nur 1 µl zu den Ansätzen der ersten Hybridisierungsrunde zu geben, wurde alles eingesetzt. Es wurde also ein 6facher Überschuß im Vergleich zum Standardprotokoll eingesetzt.

Überprüfung der Subtraktionseffizienz/Driver cDNA-Amplifikation

Zur Überprüfung der Effizienz der Subtraktion (s. Abb. 4) über eine *Southern-Blot*-Analyse müssen amplifizierte *RsaI*-Fragmente des Drivers MTPa hergestellt werden, da es sich auch bei der subtrahierten Bank ML um *RsaI*-verdaute cDNA-Fragmente handelt.

Nach *RsaI*-Verdau der MTPa-cDNA wurden Adaptoren (*Eco-Linker*) an die Fragmente ligiert und mit Hilfe der entsprechenden PCR-Primer (*Eco-Linker-Primer*) gemäß den Bedingungen der 2. PCR der SSH amplifiziert. MTLY wurde in Form der Testerfraktion 1c (s. SSH-Handbuch) eingesetzt.

Ligation in einen TA-Vektor

Die Ligation der PCR-Produkte der 2. PCR-Runde der SSH erfolgte in einem TA-Vektor (pCRII.1, Invitrogen). Die Klonierung eines Inserts in den pCR.II.1-Vektor unterbricht die kodierende Sequenz des β -Galactosidase-Gens, sodaß rekombinante Klone (weiß) von Leervektoren (blau) unterschieden werden können. Da die verwendete Taq-Polymerase aber *proofreading*-Aktivität besitzt, ist es notwendig, die PCR-Produkte nach vorangegangener Phenol/Chloroformextraktion, in einem weiteren Schritt für 15 min bei 72°C mit dATP und einer anderen Taq-DNA-Polymerase (Eurobio-Taq-Polymerase) zu inkubieren und wieder eine Phenol/Chloroformextraktion vorzunehmen. Die Ligation erfolgte mit der dem Vektor beigefügten T4-DNA-Ligase (Invitrogen) im Verhältnis 1: 1 (je 25 ng Vektor und Subtrahierte Bank).

Transformation in elektrokompente Bakterien und Blau/Weiß-Sortierung

Die in den pCRII.1-Vektor ligierte Bank wurde in elektrokompente Bakterien (ELEKTROMAX, Stamm DH10B, Invitrogen) transformiert und auf 15 cm große Bakterienplatten ausplattiert. Die Platten enthielten neben LB-Agar, das Selektionsantibiotikum Ampicillin (100 µg/ml), sowie 100 µM IPTG und X-Gal (50 µg/ml) zur Blau/Weiß-Sortierung. Die Bakterienplatten wurden bei 37°C inkubiert, bis kleine Kolonien sichtbar waren. Zur besseren Unterscheidung von weißen und blauen Kolonien wurden die Platten anschließend bei 4°C inkubiert.

Picken von Klonen und Kolonie-PCR

Eine Gesamtzahl von 1985 Klonen wurde unter Blau/Weiß-Selektion gepickt, in sterile 96-well-Mikrotiterplatten übertragen, die LB-Medium und Ampicillin enthielten (100µg/µl). Die Bakterien in diesen Platten wurden für 14 Stunden bei leichtem Schütteln bei RT wachsen gelassen. Zur Durchführung der Kolonie-PCR wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette 10µl einer jeden Bakterienkultur entnommen und in eine 96-well-PCR-Platte übertragen und dort mit je 90µl sterilem Wasser vermischt. Zur Denaturierung wurde die Platte für 5 min bei 95°C in der PCR-Maschine (Perkin-Elmer 9600 *thermal cycler*) inkubiert. 5 µl eines jeden Lysats wurden mit einer Multikanalpipette in eine zweite 96-well-PCR-Platte übertragen, in die jeweils 95 µl des PCR-Gemischs vorgelegt worden war. Die cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe der *Nested Primer* 1 und 2 der Subtraktion amplifiziert.

PCR-Mischung (50 µl-Ansatz):	0,5 U Taq Polymerase (Promega), 5 µl 10xPCR-Puffer (Promega), 200 µM dNTPs, je 10 µmol des Nested Primers 1 und 2 der Subtraktionsreaktion + 5 µl des Bakterienlysats
PCR-Bedingungen:	94°C, 30 Sekunden - 68°C, 30 Sekunden - 72°C, 30 Sekunden

Reverse-Northern-Blot-Analyse

Diese Nachselektion erfolgte über eine sog. *Reverse-Northern-Blot-Analyse*. Hierzu wurden die amplifizierten cDNA Fragmente (Kolonie-PCR) in identischer Anordnung auf 2 *high density*-Agarosegele (CentipedeTM-Gelelektrophoresekammern, Owl Scientific, Woburn, USA) aufgetragen. Es wurden 2 x 96 Proben (2 Mikrotiterplatten) pro Gel aufgetragen. Hierbei ist es von größter Wichtigkeit, daß beide Gele exakt gleich beladen werden. Auf den letzten Platz wurde jeweils eine GAPDH-Kontrolle zur späteren Quantifizierung der Signalstärke aufgetragen. Nach alkalischem Blotting (s. *Southern-Blot-Analyse*) wurden die Membranduplikate mit ³²P-markierter Tester (MTLY)- bzw. Driver (MTPa)-cDNA (jeweils *RsaI*-verdaut), hybridisiert und autoradiographisch ausgewertet.

Herstellung von Hybridisierungssonden der isolierten cDNA-Fragmente

Die cDNA-Fragmente wurden zur Sondenherstellung dem Prinzip der Kolonie-PCR folgend, mit Hilfe der *Nested Primer* 1 und 2 der Subtraktion aus den entsprechenden Bakterienklonen amplifiziert.

PCR-Mischung (50 µl-Ansatz):	0,5 U Taq Polymerase (Promega), 5 µl 10xPCR-Puffer (Promega), 200 µM dNTPs, je 10 µmol des Nested Primers 1 und 2 der Subtraktionsreaktion + 5 µl des Bakterienlysats
PCR-Bedingungen:	94°C, 30 Sekunden - 68°C, 30 Sekunden - 72°C, 30 Sekunden

Ergebnisse

1 Das 13762NF-Rattenadenokarzinomsystem

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Set von Genen zu identifizieren, welches ausschließlich oder bevorzugt in metastasierenden Krebszellen exprimiert wird. Ausgangsmaterial war ein Rattentumorsystem (13762NF-System), welches sich aus verschiedenen genetisch eng verwandten Zelllinien zusammensetzt. Bei dem 13762NF-System handelt es sich um Adenokarzinomzelllinien, die aus einem Mammakarzinom und dessen Metastasen von Ratten des Fischer 344-CRBL-Stammes etabliert wurden (Neri *et al.*, 1982; Abb.4). Die Zelllinie 13762 war von Segaloff *et al.* (1966), nach Induktion von Tumoren durch orale Verabreichung von 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazin, isoliert worden. Ein induzierter Tumor wurde mehrmals *in vivo* in syngenen Ratten passagiert. Zur Etablierung unterschiedlicher Zelllinien wurde ein Tumorstück in das Fettgewebe der Brustdrüsen von Ratten implantiert. Nach Entstehung eines Primärtumors und von Sekundärtumoren in den Lymphknoten und der Lunge wurden die entsprechenden Organe entnommen und Zelllinien aus Einzelzellen etabliert (Neri *et al.*, 1981b; Neri *et al.*, 1982).

Implantation eines 2-3 mm großen 13762 NF-Tumors
in das Brustfettgewebe einer Fischer-344-Ratte

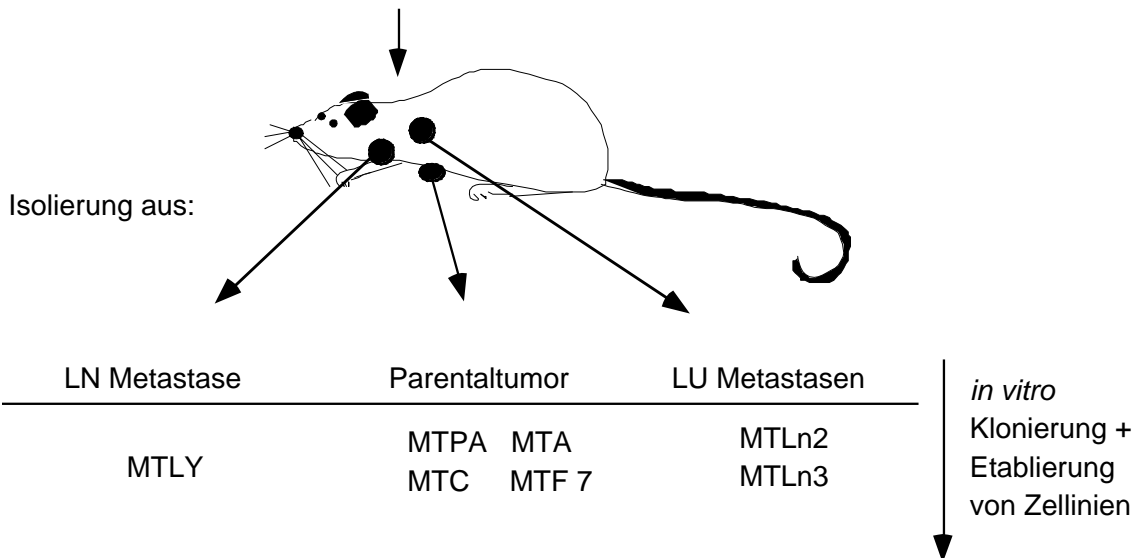


Abb. 4 Etablierung des 13762NF-System. Nach Implantation eines definierten 13762NF-Tumorstückes kam es zur Bildung eines Primärtumors und spontaner Metastasen in Lunge und Lymphknoten. Nach Isolierung der Primär- und Sekundärtumore wurden einzelne Zelllinien kloniert. LN = Lymphknoten; LU = Lunge (grafisch dargestellt nach Neri *et al.*, 1981a; Neri *et al.*, 1982)

In *in vivo*-Analysen wurden diese Zelllinien auf ihre Fähigkeiten getestet, Metastasen, ausgehend von s.c. induzierten Tumorzellen, zu bilden. Aus dem Primärtumor wurden sowohl nicht metastatische, als auch metastatische Zelllinien erhalten. Die Zelllinien aus den Metastasen waren alle metastasierend und zeigten stärkeres metastatisches Verhalten als die aus dem Primärtumor klonierten MTPa- und MTC-Linien (Neri *et al.*, 1981a; Neri *et al.*, 1982; North & Nicolson, 1985). Das Metastasierungsverhalten dieser Rattentumorzelllinien entspricht dem invasiver menschlicher Karzinome; der Ausbreitung über das lymphatische System in die regionalen Lymphknoten folgt die Streuung der Tumorzellen über die Blutbahn in die Zielorgane, wie Lunge und endet in der Kolonisierung von Knochen und Gehirn (North & Nicolson, 1985).

Zur Isolierung differenziell exprimierter Gene (cDNA) wurden aus diesem Tumorsystem zwei Linien ausgewählt, die sich am stärksten in ihrem metastatischen Verhalten unterscheiden. Dazu wurde das in der Literatur beschriebene metastatische Verhalten der einzelnen Zelllinien durch subkutane Injektion in syngene Ratten des Fischer-344-Stammes überprüft. Subkutane Injektion von 5×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinien führte in allen Tieren zur Ausbildung von Primärtumoren. Die aus einem Primärtumor klonierte Zelllinie MTPa bildete keine Metastasen. Die 4 anderen getesteten Zelllinien MTC, MTLN-2, MTLN-3 und MTLY, entwickelten alle Metastasen in der Lunge und in Lymphknoten, zeigten jedoch ein unterschiedliches Metastasierungspotential. Die aus einer Lymphknotenmetastase klonierte Zelllinie MTLY führte in einem Fall zur Ausbildung von Lungenmetastasen, jedoch in allen Fällen zu Lymphknotenmetastasen (**Tabelle 3**). Für die Subtraktion wurde MTPa als nicht metastasierende und MTLY als stark metastatische Zelllinie ausgewählt.

Zelllinie	Primär-tumor	Tiere mit LN-Mets	Tiere mit LU-Mets
MTPa	3/3	0/3	0/3
MTC	6/6	1/6	2/6
MTLN-2	6/6	1/6	2/6
MTLN-3	6/6	2/6	2/6
MTLY	6/6	6/6	1/6

Tabelle 3. Überprüfung des metastatischen Potentials der 13762NF-Rattenzelllinien *in vivo* durch subkutane Injektion Eine Gesamtzahl von 5×10^5 Zellen in PBS wurde s.c. in die Flanke eines jeden Tieres injiziert. Für diese Untersuchungen wurden 3-6 Tiere pro Zelllinie eingesetzt. Die Tiere wurden so lange am Leben gelassen, bis der Primärtumor die durch das deutsche Gesetz erlaubte Größe erreicht hatte oder Anzeichen von Leiden zu erkennen waren. Bei der Obduktion wurden die Tiere auf primäre und sekundäre Tumoren (Metastasen) hin untersucht. Während alle Zelllinien einen Primärtumor verursachten, zeigte nur die MTPa-Linie kein metastatisches Verhalten. LN = Lymphknoten, LU = Lunge, Mets = Metastasen.

2 Subtraktive Klonierung von differenziell exprimierten Genen

2.1 Prinzip der *Suppressive Subtractive Hybridization* (SSH)

Die Technik der *Suppressive Subtractive Hybridization* (im Folgenden als SSH bezeichnet; Diatchenko *et al.*, 1996) erlaubt die Isolierung differenziell exprimierter Gene aus zwei mRNA-Populationen. Die Population, deren differenziell exprimierte Transkripte man identifizieren möchte, wird als "Tester" bezeichnet, die von ihr zu subtrahierende Population als "Driver". In dieser Arbeit sollten metastasierungs-assoziierte Sequenzen identifiziert werden, dementsprechend diente zu cDNA umgeschriebene RNA aus der metastatischen Zelllinie MTLY als Tester, die cDNA aus der nicht metastatischen Zelllinie MTPa als Driver. Gemeinsam in Tester und Driver exprimierte Sequenzen wurden eliminiert und differenziell exprimierte Gene aus der Testerpopulation amplifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, daß Sequenzen mit geringer Abundanz gegenüber häufiger vorkommenden angereichert werden und dadurch isoliert werden können.

2.2 Durchführung der Subtraktionsreaktion

In einem ersten Schritt wurden jeweils 2 µg Poly(A)⁺ RNA des Testers und Drivers zu cDNA mit Hilfe eines speziellen Oligo-dT-Primers umgeschrieben. Dieser *cDNA Synthesis Primer* (Clontech) besteht neben einer Oligo-dT-Kette aus der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *RsaI* und ermöglicht die Isolierung des 3'-Endes differenziell exprimierter Gene. Die Sequenz der 3'-UTR-Region ermöglicht eine eindeutige Identifikation der analysierten Genfragmente. Nach Herstellung des komplementären Zweitstranges, erfolgt ein Restriktionsverdau mit *RsaI*, wobei im Durchschnitt 256 bp lange Oligonukleotide mit stumpfen Enden entstehen, an die Adaptoren ligiert werden können. Die Enden der Adaptoren besitzen keine Phosphatgruppe, so daß nur ein Strang eines Adaptors an das 5'-Ende der cDNA ligieren kann. Die Tester-cDNA wird in 2 Subpopulationen unterteilt und an diese jeweils Adaptor 1 bzw. Adaptor 2 ligiert. Die Subtraktionsreaktion setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen und aus zwei sich anschließenden PCR-Reaktionen zusammen (Abb. 5).

Nach Denaturierung der cDNAs wird in der ersten Hybridisierung zu jeder Testergruppe Driver-cDNA im Überschuß gegeben (Abb 5). Die einzelsträngigen cDNA-Moleküle können nun miteinander hybridisieren. Alle Sequenzen, die sowohl in den Tester-, als auch in den Driverzellen exprimiert werden, wie GAPDH, können miteinander hybridisieren, da Driver-cDNA im Überschuß eingesetzt wird (c, in Abb. 5). Der Teil der Tester-Sequenzen, die mit hoher Abundanz exprimiert werden, hybridisiert miteinander (b), während der überwiegende Teil, die in geringer Menge exprimierten Sequenzen, einzelsträngig bleibt (a). Dieser Normalisierungsschritt begünstigt eine Unterdrückung der Amplifikation der hoch abundanten cDNAs und in Folge eine sog. Normalisierung der PCR-Produkte (nähere Erläuterung bei Text zu Abb. 5). So hat die erste Hybridisierung zum einen den Effekt, daß nicht differenziell exprimierte Gene in Form von Tester/Driver-Hybriden (c) nur linear amplifiziert werden können und zum anderen, daß wenig abundante differenziell exprimierte Sequenzen genauso stark wie hoch abundante Sequenzen amplifiziert werden können.

Für die zweite Hybridisierung werden die getrennten Ansätze der 1. Hybridisierung ohne Denaturierung vereinigt, so daß alle bereits gebildeten Hybride erhalten bleiben. Erneut wird ein Überschuß an denaturierter Driver MTPa-cDNA hinzugefügt, um die Subtraktion so effektiv wie möglich zu machen, und anschließend hybridisiert (hier wurde eine wichtige Veränderung im Vergleich zum Standardprotokoll vorgenommen, s. Methodenteil, Abschnitt 7). Nach der Hybridisierung verbleibt eine Anzahl von Produkten (a, b, c, d, e; s. Abb. 5), wobei besonders die neu gebildeten Hybride e wichtig sind. Nun werden alle Enden aufgefüllt und die Produkte mit Hilfe der PCR und spezifischer Primer für Adaptor 1 (Hinreaktion) und Adaptor 2 (Rückreaktion) amplifiziert. Nur Produkte von testerspezifischen Sequenzen mit unterschiedlichen Adaptoren am 5'- und 3'- Ende werden exponentiell amplifiziert. Dieser Amplifikation wurde eine 2. PCR mit je einem "nested" Primer für Adaptor 1- und Adaptor 2-Sequenzen angeschlossen, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Um ein optimales Resultat zu erhalten, war es notwendig, die Anzahl der PCR-Zyklen sowohl für die 1. PCR, als auch die 2. PCR zu optimieren (Daten nicht gezeigt). Als beste Kombination erwiesen sich 30 Zyklen für die erste PCR und 17 für die 2. PCR.

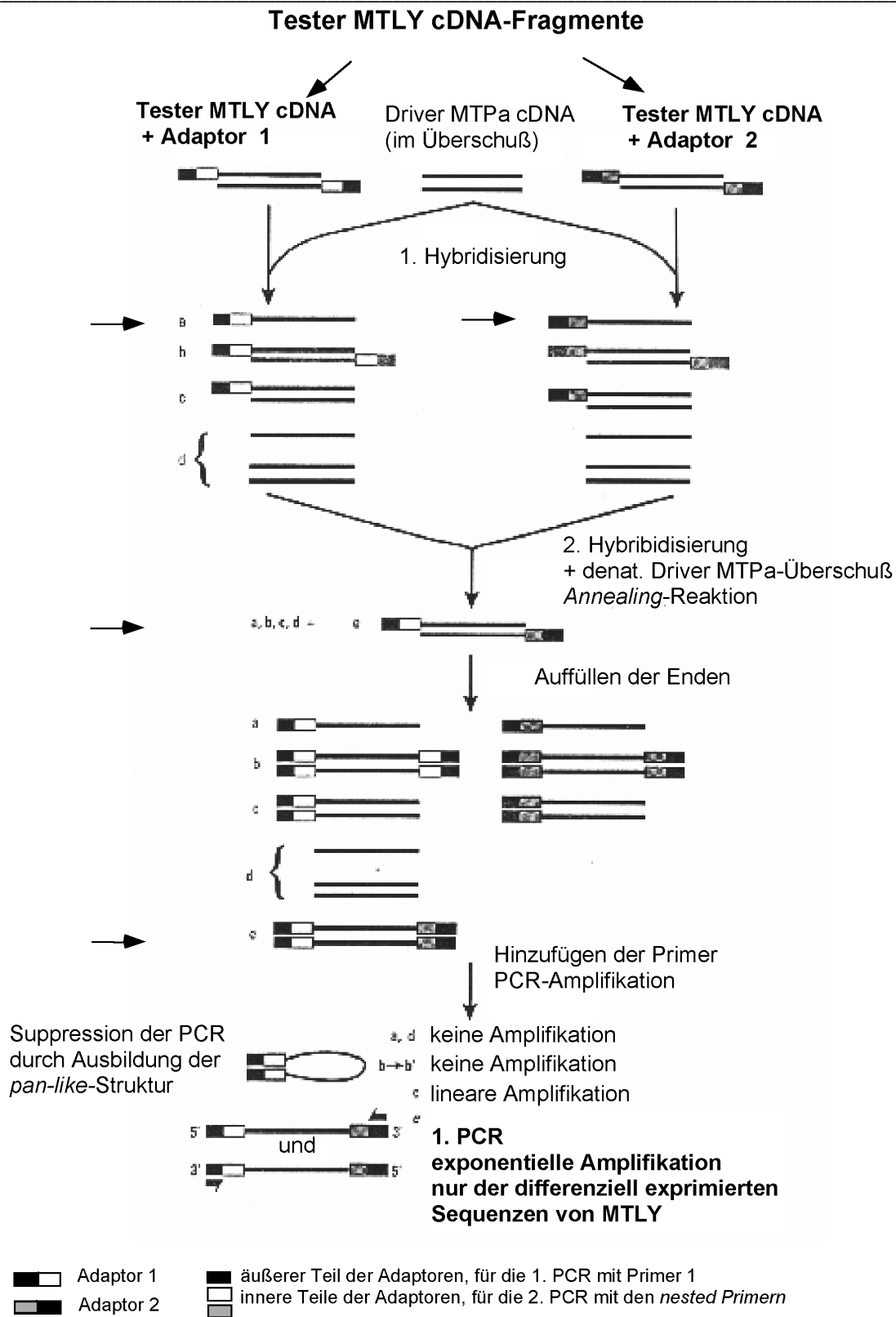


Abb. 5 Schematische Darstellung der PCR-Select cDNA Subtraktion. Die exponentielle Amplifikation erfolgt nur bei Typ e-Molekülen (Sequenz nicht im Driver vorhanden). Schwarze Linien symbolisieren *RsaI*-verdaute cDNA-Fragmente von Tester MTLY und Driver MTPa. Die 2. PCR ist nicht aufgeführt. Weitere Erklärung im Text und Informationen über eine Veränderung des Protokolls im Methodenteil (verändert nach dem Benutzerhandbuch CLONTECH PCR-SELECT™ cDNA Subtraction Kit, Clontech).

Die SSH, wie beschrieben durchgeführt, sollte einerseits nur testerspezifisch exprimierte Sequenzen amplifizieren, andererseits sollten Sequenzen, die in geringen Mengen vorkommen, gegenüber den abundanteren angereichert werden. Letzteres erfolgt über die erste Hybridisierungsreaktion und die folgende Suppressions-PCR (Siebert *et al.*, 1995). Gene, die nicht nur differenziell, sondern auch in hoher Rate exprimiert werden, führen zu Hybriden vom Typ b. Da beide Stränge am 5'-Ende den gleichen Adaptor besitzen, kommt es nach der Auffüllreaktion zur Bildung sogenannter *inverted repeats*. Nach einem Denaturierungsschritt binden diese kurzen Sequenzen an den Enden derselben Sequenz bevorzugt aneinander und bilden eine hantelartige (*Pan-like*) Struktur aus, wodurch die Amplifikation dieses Fragments unterdrückt wird (Abb. 6). Diese Normalisierung stellt das Herzstück der SSH dar und ermöglicht die Identifikation von Zielgenen mit geringer Abundanz.

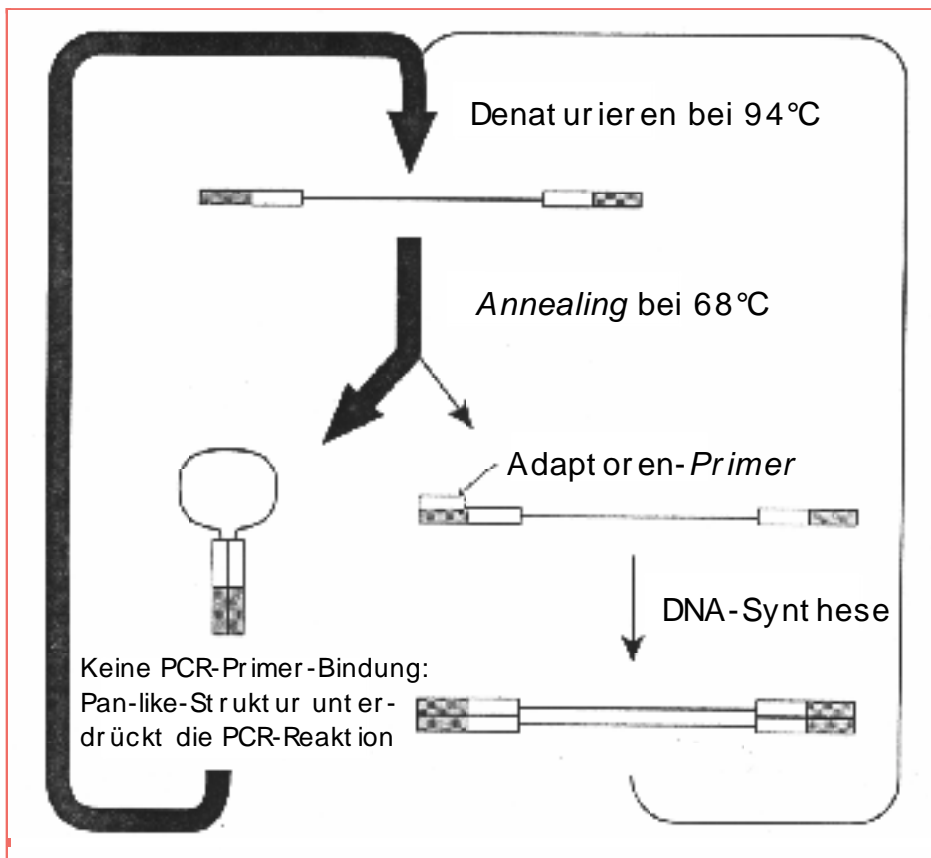


Abb 6. Suppressions-PCR.

Bei häufig repräsentierten cDNA-Fragmenten kommt es zur Ligation des gleichen Adaptors an ein Fragment gleicher Identität innerhalb einer Testersubpopulation. Nach der Auffüllreaktion entstehen sog. *inverted terminal repeats*. Nach dem Denaturierungsschritt der PCR binden in diesem Fall nicht zwei vollständige cDNA-Fragmente aneinander, sondern bevorzugt diese kurzen, zu einander komplementären Adaptorsequenzen der cDNA-Fragmente (*inverted terminal repeats*), wodurch die Ausbildung einer sog. *pan-like* Struktur bedingt wird und die Amplifikation dieses Fragments unterdrückt wird (nach Siebert *et al.*, 1995).

2.3 Eliminierung gemeinsam in Tester- und Driver-Zellen exprimierter Genen durch die SSH

Nach Durchführung der Subtraktion mit cDNA der MTLY-Linie als Tester und cDNA der MTPa-Linie als Driver wurde zunächst überprüft, ob, wie postuliert, tatsächlich gemeinsam exprimierte Sequenzen eliminiert wurden. Für diese Überprüfung eignen sich konstitutiv aktive Gene, sog. *housekeeping*-Gene, wie GAPDH und β -Actin, die in allen Zellen gleichermaßen exprimiert werden, weil sie für Proteine mit grundlegenden Funktionen kodieren. Die PCR-Produkte vor der Hybridisierung, getrennt aus Driver- und Tester-Ansatz, wurden mit den PCR-Produkten der Subtraktion auf Agarosegelen separiert (Bahnen S, T, D, in Abb. 7) und mit Proben der *housekeeping*-Gene, sowie 3 weiterer Gene (CD44s, Topoisomerase II, Gangliosid-Synthetase) hybridisiert (Abb. 7).

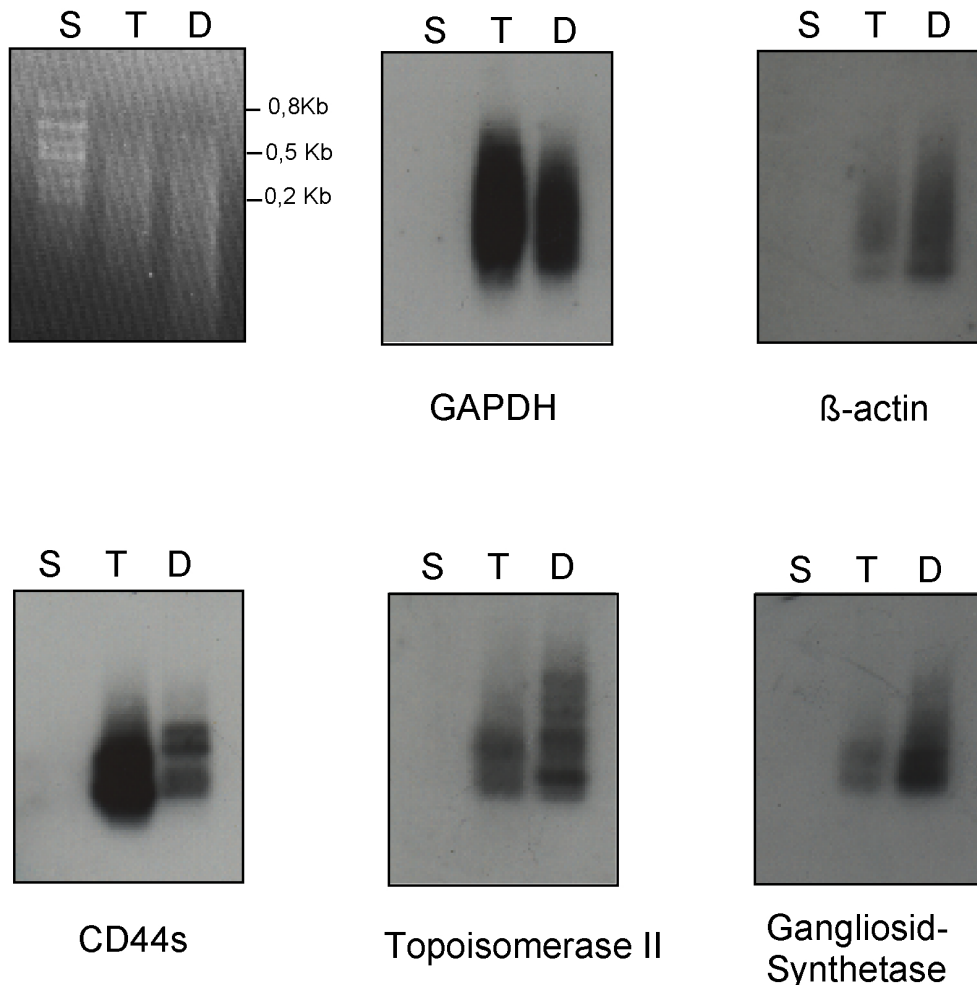


Abb. 7 Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der Eliminierung gemeinsam exprimierter Gene. Amplifizierte cDNA-Fragmente von Subtraktion, Tester MTLY und Driver MTPa wurden in gleichen Mengen in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (links oben). Die auf Membranen transferierten DNA-Fragmente wurden mit 32 P-markierten Sonden der genannten Gene hybridisiert. Diese 5 Gene, welche sowohl im Tester, als auch im Driver exprimiert werden, sind bei der subtrahierten Bibliothek nicht vorhanden. Auf die Erzeugung und Amplifikation der cDNA-Fragmente von Tester und Driver wird im Methodenteil eingegangen. S=Subtraktion, T=Tester MTLY, D=Driver MTPa

Diese Gene werden in den beiden Ausgangszelllinien MTPa (D-Bahnen) und MTLY (T-Bahnen) exprimiert. Aus der gleichen Abbildung geht deutlich hervor, daß sie nach der Subtraktion nicht mehr vorhanden sind. Damit ist die Grundbedingung durch den experimentellen Ansatz erfüllt.

Die in der 2. PCR-Runde amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einen Vektor kloniert und somit eine Bank mit differenziell exprimierten Sequenzen hergestellt. Diese Mammakarzinom-spezifische Bibliothek (engl. *library*) wird im folgenden u.a. als ML bezeichnet (*Mammary Carcinoma specific Library*). Die Klonierung der Subtraktionsprodukte erfolgte in einem TA-Vektor (pCR.II.1). TA-Vektoren besitzen ein 3'-terminales Thymidin an beiden Enden. Diese Überhänge verbessern die Effizienz der Ligation eines PCR-Produktes beträchtlich, indem sie die Selbstverknüpfung des Vektors verhindern und darüberhinaus einen passenden Überhang für PCR-Produkte darstellen. Die Klonierung eines Inserts in den Vektor unterbricht die kodierende Sequenz des β -Galactosidase-Gens, so daß rekombinante Klone (weiß) von Leervektoren (blau) unterschieden werden können (s. Methodenteil, Abschnitt 7).

2.4 Analyse von Klonen der Subtraktionsbank ML

Nach Anlegen der Subtraktionsbank ML durch Klonierung, sollte eine repräsentative Anzahl von Klonen analysiert werden. Da nicht bekannt ist, wieviele Gene im Zuge der Metastasierung hochreguliert sein könnten und auch nicht klar war, wieviele cDNAs "falsch positiv" sind (nicht differenziell exprimierten Sequenzen entsprechen) wurden nahezu 2000 Klone isoliert; eine Zahl deren Analyse technisch gut machbar ist.

Um herauszufinden, welche dieser Klone tatsächlich differenziell exprimierte cDNA-Fragmente enthielten, erfolgte eine Überprüfung über die *Reverse-Northern-Blot*-Analyse. Hierzu wurden die cDNA-Fragmente der Klone jeweils amplifiziert (Kolonie-PCR; s. Methodenteil, Abschnitt 7) und die Amplifikationsprodukte in identischer Anordnung und Menge auf zwei *high-density*-Agarosegele (Duplikate) geladen. Zusätzlich wurde jeweils eine GAPDH-Kontrolle zur späteren Quantifizierung der Hybridisierungsreaktion aufgetragen. Nach Transfer der cDNA-Fragmente auf Membranen wurden die Membranduplikate mit ^{32}P -markierter Tester (MTLY)- bzw. Driver (MTPa)-cDNA, hybridisiert und autoradiographisch ausgewertet (Abb. 8).

Die GAPDH-Kontrolle auf beiden Membranen erlaubte den Vergleich gleich stark hybridisierter und exponierter Autoradiogramme. Die mit den cDNA-Fragmenten erhaltenen Signale lassen sich grob in 3 Klassen einteilen. Eine Gruppe von Klonen zeigte ausschließlich bei der Hybridisierung mit der Tester-cDNA ein Signal. Eine weitere Gruppe

hybridisierte schwach mit der Driver-cDNA, aber sehr stark mit der Tester-cDNA. Diese Klone enthalten metastasierungsspezifisch exprimierte cDNA-Fragmente. Die restlichen Klone zeigten ein gleich starkes Signal bei der Hybridisierung mit beiden cDNA-Populationen und stellen nicht differenziell exprimierte Gene dar.

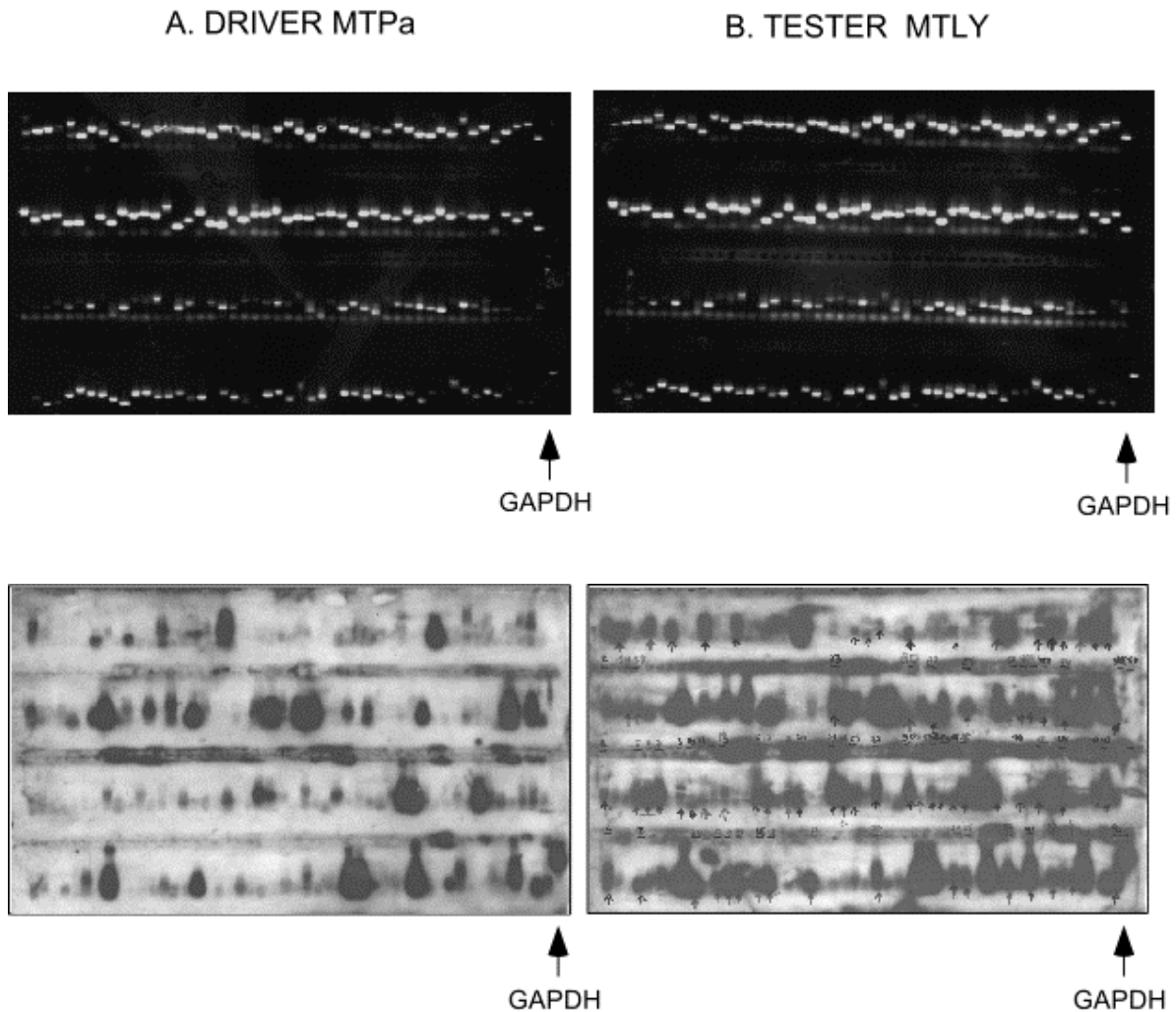


Abb. 8 Radioaktive Hybridisierung 198 ausgewählter Klone der Subtrahierten Bank MTLY - MTPa aus 2 Mikrotiterplatten in identischer Anordnung, Ladung und Auftrennung auf zwei 1,2 % *high density*-Agarosegelen. Nach alkalischem Blotten wurden die Membranduplikate mit ^{32}P -markierter Tester (MTLY)- oder Driver (MTPa)-cDNA (jeweils *RsaI*-verdaut) hybridisiert und autoradiographisch ausgewertet. GAPDH diente als Kontrolle zur Quantifizierung der Signalstärke. Klone, welche ein stärkeres (35), bzw. ausschließliches (37) Signal mit MTLY zeigten, sind in dieser Zeile gegenüber MTPa differenziell exprimiert.

Bei der in Abb. 8 dargestellten *Reverse-Northern-Blot*-Analyse von 198 Klonen sind 35 Klone signifikant verstärkt und 37 Klone ausschließlich im Tester MTLY exprimiert. Somit werden bei dem gezeigten Beispiel 72 von 198 Klonen differenziell transkribiert. Eine Gesamtzahl von 1985 Klonen wurde auf diese Weise analysiert, die letztendlich zur Identifizierung von 487 differenziell exprimierten cDNAs führte.

3 Charakterisierung der differenziell exprimierten Klone

3.1 Northern-Blot-Analyse und Kontrollsequenzierung von stichprobenartig gewählten Klonen

Die Überprüfung der subtrahierten Klone auf Testerspezifität war durch *Reverse Northern-Blot*-Analyse erfolgt, da diese einen Massentest mit geringerem Aufwand als die *Northern-Blot*-Analyse ermöglicht. Stichprobenartig wurde die Spezifität dieser Reaktion durch *Northern-Blot*-Analysen geprüft.

Willkürlich wurden 4 Kolonien aus der ML-Bank mit Spezifität der Expression nur in der Testerlinie MTLY nach *Reverser-Northern-Blot*-Analyse ausgewählt. Aus der Plasmid-DNA dieser Kolonien wurden die inserierten Sequenzen amplifiziert und radioaktiv markiert (Kolonie-PCR, s. Methodenteil, Abschnitt 3.7.5). Poly (A)⁺ RNA der MTLY- und der MTPa-Linie wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Nach Hybridisierung der Membranen mit den jeweiligen Sonden wurde das Autoradiogramm exponiert. Alle 4 cDNA-Fragmente wurden nicht nur differenziell, sondern sogar ausschließlich in der metastatischen Zelllinie MTLY exprimiert (Abb. 9).

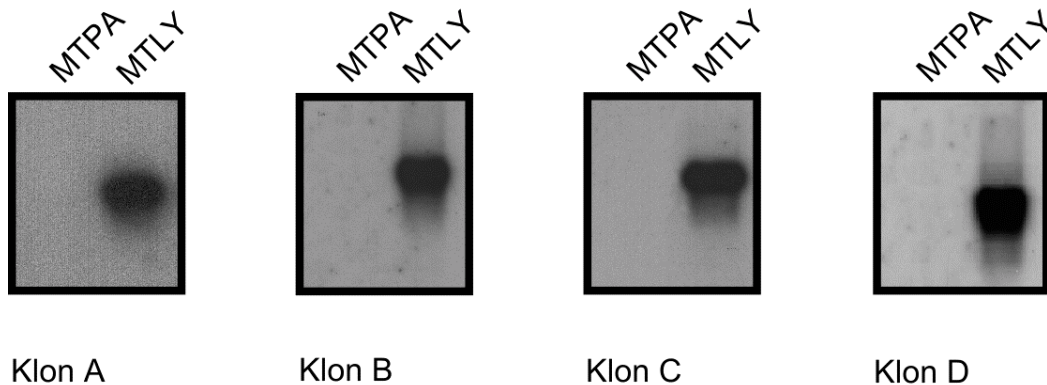


Abb. 9 Nachweis der differenziellen Expression von stichprobenartig gewählten Subtraktionsfragmenten Um zu bestätigen, daß über die *Reverse-Northern-Blot*-Analyse zuverlässig differenziell exprimierte cDNA-Fragmente zu identifizieren sind, wurde die Expression von 4 stichprobenartig gewählten Genen durch *Northern-Blot*-Analyse überprüft. Jeweils 2 µg Poly (A)⁺ RNA der nicht metastasierenden MTPa-Linie und der metastasierenden MTLY-Linie wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit ³²P-radioaktiv markierten Sonden der Fragmente hybridisiert.

Diese *Northern-Blot*-Analyse bestätigt das Ergebnis der Analyse über *Reverse-Northern*-Blots. Somit konnte bekräftigt werden, daß die Subtraktion erfolgreich war: 25 % der

klonierten Sequenzen werden ausschließlich oder überwiegend im Tester MTLY exprimiert.

Zur Optimierung der weiteren Vorgehensweise wurden die 4 Klone sequenziert. Damit sollte untersucht werden, ob diese Klone unterschiedliche Sequenzen besitzen und von bereits bekannten Genen stammen oder neu sind. Entsprechen sie bekannten Genen, könnten alle Sequenzen dieser Gene in der ML-Bibliothek durch Hybridisierung bestimmt werden und müßten dann nicht mehr sequenziert werden.

Nach Durchführung des Sequenzvergleichs in den öffentlichen Datenbanken (*Blastn sequence similarity search*, NCBI), zeigte sich, daß diese 4 cDNA-Fragmente Sequenzen dreier unterschiedlicher Gene enthielten. Dies sind die Zytokeratine 7, 8 und 19. Eine Überprüfung der veröffentlichten Literatur ergab, daß alle 3 Zytokeratine nicht nur bereits im Zusammenhang mit Metastasierung beschrieben worden waren, sondern teilweise als Markergene bei der Identifikation von Mikrometastasen bei Brustkrebs (Zytokeratin 19; Schönfeld *et al.*, 1996), bzw. zur Unterscheidung zwischen primären Ovarumoren oder Darmmetastasen im Ovar (Zytokeratin 7, Wauters *et al.*, 1995) eingesetzt werden.

3.2 Identität aller differenziell exprimierten Gene

Nachdem klar war, daß die in der *Reversen-Northern-Blot-Analyse* als differenziell exprimiert identifizierten Gene tatsächlich spezifisch in der metastasierenden MTLY-Linie exprimiert sind, sollten alle diese Sequenzen identifiziert werden.

Um den Arbeitsaufwand zu optimieren, sollten zunächst alle Sequenzen der bereits identifizierten Zytokeratine 7, 8 und 19 durch Hybridisierung in der ML-Bank bestimmt werden und von der Sequenzierung ausgeschlossen werden. Zur Sondenherstellung wurden anhand der bekannten Sequenzen Primer verwendet, die es erlaubten, durch PCR die vollständige Sequenz zu amplifizieren. Nach erfolgreicher Gesamtlängen-PCR wurden die Produkte mit *RsaI* verdaut, vereinigt, radioaktiv markiert und mit allen 487 differenziell exprimierten Klone hybridisiert (*Reverse-Northern-Blot-Analyse*). Nach einer Expositionszeit des Autoradiogramms von einigen Stunden konnten 120 Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte gezeigt werden, daß insgesamt 124 (120 + 4) Klone für Fragmente der 3 Zytokeratine 7, 8 und 19 kodierten. Diese Klone wurden von der nachfolgenden Sequenzierung ausgenommen.

Die Plasmid-DNA der restlichen 363 Klone wurde isoliert und die inserierte cDNA sequenziert. Der größte Teil davon wurde kommerziell sequenziert (4base lab GmbH, Reutlingen & Lion AG, Heidelberg). Sequenzen, welche für 3'-Enden kodierten, wurden

von der anderen Richtung aus nachsequenziert, da eine zuverlässige Sequenzierung der 3'-Enden aus technischen Gründen oft nicht möglich ist (Strangabbruch durch zu lange Poly-T-, bzw. Poly-A-Sequenz, oder nicht genau zuordenbare Basen).

Vor den *Blast*-Analysen, mit denen Sequenzen verglichen werden können, wurden die Sequenzen über ein von Herrn Dr. Thies entwickeltes Programm bearbeitet, welches die Adaptorsequenzen automatisch erkennt und nicht berücksichtigt, so daß nur die inserierten Fragmente miteinander verglichen werden können. In der ersten Vergleichsrunde wurden alle Sequenzen untereinander verglichen (*blast* und *fast a*- Programme), um in der nächsten Runde redundante Sequenzen nur einmal mit den Sequenzen der öffentlichen Datenbanken zu vergleichen (Programm: *Blast*, Altschul *et al.*, 1997). Die Homologievergleiche in den Datenbanken wurden stets mit der Nukleotid-Sequenz und nicht mit der translatierten Proteinsequenz durchgeführt (Henikoff *et al.*, 1998). Alle Computeranalysen bezüglich der Identität der Klone, wurden unter Benutzung der öffentlichen Datenbanken mit humanen und Nagersequenzen durchgeführt (*Blastn sequence similarity search*, NCBI, einschließlich aller nicht-redundanten Genbanken: GenBank+EMBL+DDBJ+PDB-Sequenzen, sowie den DDBJ EST-*Divisions*).

Die Datenbankanalyse ergab, daß die 487 differenziell exprimierten Klone 162 Genen entsprechen, mit der Einschränkung, daß einige der neuen Sequenzen vom gleichen Gen stammen könnten. Da dies aber nicht nachzuprüfen ist, wurden sie bei der Auswertung wie unabhängige Gene behandelt (Tab. 4).

Auswertung der Subtraktion

Untersuchte Klone	Differenziell exprimierte Klone	Anteil der diff. expr. Gene	Individuelle Gene
1985	487	25 %	162

Tabelle 4. Auswertung der Subtraktion anhand der *Reverse-Northern-Blot-Analyse*. Eine Gesamtzahl von 1985 Klonen wurde analysiert, die in 487 (25%) differenziell exprimierten cDNAs resultierten, die letztendlich für 162 individuelle Genen kodierten (unter der Prämisse, daß jede neue Sequenz für ein anderes neues Gen kodiert).

Mit Hilfe der Datenbankanalyse wurden die cDNA-Fragmente anhand der Homologie zu bereits bekannten Sequenzen gruppiert. Bei einer Homologie von unter 70 % zu diesen bekannten Sequenzen wurden die cDNA-Fragmente nach ihrem Homologiegrad zu ESTs

untergliedert (Tab. 5). Die Länge der analysierten Fragmente beträgt zwischen 128 und 713 Basenpaaren (3 Ausnahmen). Dadurch war ein zuverlässiger Homologievergleich gewährleistet.

Tabelle 5. Auflistung der differenziell exprimierten Gene entsprechend ihrer Homologie zu bekannten Genen und ESTs.

Die Listen stellen das Ergebnis der vergleichenden Sequenzanalyse mit humanen und Nagersequenzen der öffentlichen Datenbanken (NCBI, einschließlich aller nicht-redundanten Genbanken:

GenBank+EMBL+DDBJ+PDB-Sequenzen, sowie DDBJ-EST-Division) dar.

Schlüssel der Tabellenüberschriften: Homologie (Homologie zum Referenz-Gen in Prozent), Länge in bp (Länge des für den *Blast*-Vergleich eingesetzten Fragmentes in bp), *Accessions*-Nummer (Kode des Referenz-Gens in den öffentlichen Datenbanken). *No match* = keine signifikante Homologie in den Datenbanken (Homologie zu ESTs < 70 %).

1. Identität > 90 % (zu bekannten Genen)

Klon	Homologie zu	Homologie	zu (Art)	Länge in bp	Accessionsnummer
2	Zytokeratin 8	99,4 %	Ratte	220	M63482
3	Zytokeratin 19	98 %	Ratte	198	Y00503
4	c met	99,1% 90 %	Ratte Mensch	231	X96786 X54559
6	FABP	97 %	Ratte	335	S83247
7	Thrombospondin	92,2 %	Mensch	294	S79301
8	tob	92,8 %	Mensch	207	D78382
9	SSAT	97 %	Maus	220	M55580
10	a-Tropomyosin	97,9 %	Ratte	144	M34134
11	Metatasis-associated factor	98,4 %	Ratte	381	AJ001043
12	Calmodulin	97 %	Ratte	558	X13933
13	HB2	99,7 %	Ratte	379	AB008538
14	Connexin protein Cx26	95 %	Ratte	218	X51615
15	zytosol. NADP- dep isocitrat Dehydrogenase	95,7 %	Ratte	550	L35317
16	Glutaminsynthetase	99,6 %	Ratte	499	M29599
17	PPRP II (phosphoribosyl Pyrophosphate synthetase II)	98,9 % 87,4 %	Ratte Mensch	190	M17259 Y00971
18	Ubiquitin	90,3 %	Maus	224	X92665
19	GPR2	100 %	Mensch	77	U13667
20	CD 24	99,5 %	Ratte	180	U49062, Z11663
22	TIF 1B	95,5 %	Maus	324	X99644, X97548
23	Mitochondriale Zytochromoxidase subunits I,II,III	94,7 %	Ratte	283	J01435
24	Mitochondrial oxidase c subunits I,II,III	100 %	Ratte	355	M27315
25	Cathepsin H	99,1 %	Ratte	426	Y00708
26	hnRNP = DOB	97,2 %	Ratte	211	X16933,AF039575
27	Oncomodulin	98,6 %	Ratte	660	J02705, X15838

Ergebnisse

28	ZO-1	96,2 %	Maus	371	D14340
29	Mitochondriales Zytochrom B	99,8 %	Ratte	408	J01436t
30	O-Acetyl GD3 Gangliosidsynthase	98,9 %	Ratte	351	D84068
31	Ribosomales Protein S7	99,8 %	Ratte	607	X53377
34	Class I beta-Tubulin	95,9 %	Ratte	196	ABO11679
37	Clathrin associated protein (AP47)	94 %	Maus	209	AF067146
43	SCD2 (Stearoyl-CoA desaturase)	98,8 %	Ratte	84/153	Rnu67995
65	B 23	99 %	Ratte	187	J04943
66	Cholinkinase	96,7 %	Ratte	215	D37885
67	plap (Phospholipase A2 activating protein)	96,7 %	Mensch	276	U17901
68	Tyrosinphosphatase(PRL-1)	98,2 %	Ratte	227	L27843
69	TFIIH	93,8 %	Maus	128	AJ002366
70	mEnx-1 (EZH2)	95,7 %	Maus	713	U52951
71	Cctb mRNA für CCT	92,2 %	Maus	387	Z31553
72	PDK 3	91,9 %	Mensch	518	L42452
73	Eker	96,5 %	Ratte	202	U23776
74	HPRT = IMP	96,9 %	Ratte	198	V00530; M31642
75	Carboxylesterase	97,7 %	Ratte	132	X65296
76	TGF a	98,7 %	Ratte	618	M31076
77	Ac39/physophilin (= vacuolar adenosin triph. subunit D)	94, 8%	Maus	557	U215499
78	DNA Polymerase a	95,5 %	Ratte	467	M15114
79	eIF-2 gamma subunit	91,1 %	Mensch	271	L19161
80	EF-2	98,7 %	Ratte	298	Y07504
81	Histon H10	98,7 %	Ratte	535	X70685
82	Ribosomales Protein L4	97,6 %	Mensch	508	X82180
83	Ribosomales Protein S13	95,1 %	Ratte	346	X53378
84	Ribosomales Protein S28	94,9 %	Maus	197	X00525
85	Cytochromoxidase C	92,8 %	Ratte	181	X52940
87	p62 (dok)	95,2 %	Mensch	124	M88108
88	Phospholipase A2	96,1 %	Mensch	181	M86400
89	Zytopl. Aktin γ- isoform	97,6 %	Ratte	125	X52815
91	Carnitinpalmitoyltransferase I	97,8 %	Ratte	184	L07736
92	EZRIN	90,5 %	Maus	201	X60671
100	Basolateraler Na-K-2Cl Kotransporter	100 %	Ratte	272	AF051561
107	Neuronal protein 15.6	90,3 %	Maus	236	Y08702
112	DNA-Reparaturprotein RAD52 γ- isoform	92,1 %	Mensch	151	AF125949

2. Homologie 70 - 90 % zu bekannten Genen

Klon	Homologie zu	Homologie	zu (Art)	Länge in bp	Accessionsnummer
1	Zytokeratin 7	83 %	Mensch	178	M13955
5	IAP (Inhibitor of apoptosis) /MIHC (hu IAP Homol)	87,9 %	Maus	198	U88908
21	Megakaryocyte potentiating factor	89,4 %	Ratte	377	D49441
32	m irf 6	83,2 %	Maus	435	U73029
33	TBP-associated factor 170 (TAFII170)	88,6 %	Mensch	412	AJ001017
35	Plakophilin I (PKPI)	82,8 %	Maus	209	g1707593
36	Golgin-245	84,6 %	Mensch	227	U31906
44	Calnexin	86,9 %	Mensch	199	L18887
47	HGF-activator inhibitor type 2 (Hai2)	74 %	Maus	204	AF099016
94	KS1/4 antigen (EGP-protein homolog)	87,4 %	Maus	214	M76124, M26481
96	CHO1 antigen (C.griseus) EST: rat embryo	85,6 % 99,6 %	c.gris. Ratte	250 249	X83575
97	Zytosol. NADP-dep. Isocitrat-dehydrogenase Homolog	86,5 %	Ratte	141	L35317
99	Phospholipase C beta3	88,2 %	Maus	254	U43144
105	Zytochrom C Oxidase subunit IVb	76,3 %	Mensch	211	M38259
108	Inorganische Pyrophosphatase (PP)	87,5 %	Mensch	255	AF154065
113	IQGAP2	77,7 %	Mensch	587	U51903
114	G Protein gamma-10 subunit	77,2 %	Mensch	224	U31383
116	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase/NDUFS2 sub.	85,9 %	Mensch	412	AF050640
125	Exportin (nuclear export receptor)	81,6 %	Mensch	141	Y16414
127	MAST205 protein kinase	100 %	Ratte	119	AI011822
142	IGSF4 gene	87 %	Mensch	460	AB017563
150	SIK similar protein	89,2 %	Maus	618	U02313
161	CGI-44 protein	82,8 %	Mensch	174	AF151802

3. Homologie < 70 % (Neue Gene, *Novels*) zu bekannten Genen

3.1 > 90% Homologie zu ESTs

Klon	Homologie zu	Homologie	Länge in bp	Accessionsnummer
39	EST: Rattenhirn, 3'	98 %	306	AA943149
	EST: Mensch	83,5 %	411	AA195089
40	EST: Rattenleber	99,7%	296	AI411189
45	EST: Ratte	100 %	186	AA899899
	EST: hum. Pankreas	65,1 %		Aa078850
48	EST: ähnl. hum.hepatoc GFR	90,2 %	215	H99218

Ergebnisse

	precursor			
49	EST: Ratte	98,8 %	168	AA998294
	EST: human. Tumor	83,5 %	188	AA889994
57	EST: Rattenhirn	98 %	351	AA942996
59	EST: Rattenhirn	99,5 %	185	AI229248
	EST: human	77,1 %	205	AA490885
60	EST: Maus	94,7 %	247	AA178355
	EST: human	88,4 %	276	AA521340
61	EST: Ratte	99,1 %	327	AA892179
62	EST: Ratte	100 %	410	AI146036
	EST: human	84,9 %	437	AA744381
63	EST: Ratte, 3'-Ende	99,1 %	336	AI229248
93	EST: Mausembryo	91,4 %	221	AA058083
	EST: human	81,1 %	175	R50681
98	EST: Ratte	98,7 %	298	AI029988
103	EST: Rattenhirn	97,8 %	502	AI229307
109	EST: humaner Hoden	92,1 %	305	AA446810
110	EST: Rattenplazenta	100 %	270	AI237261
	EST: humane Retina	76,5 %	281	AA001852
111	EST: Rattenlunge	90,3 %	145	AI234620
118	EST: Rattenovar	98,5 %	201	AA850325
120	EST: Ratte	99,6 %	278	AI136482
122	EST: Rattenniere	98 %	409	AA892370
123	EST: Ratte	94 %	182	AI072791
129	EST: Rattenplazenta	100 %	156	AI011822
130	EST: Rattenlunge	99,7 %	326	AA800694
131	EST: Rattengewebe	100 %	563	AA799790
	EST: hum. Neuroepithelium	83,4 %	455	AA126307
132	EST: Rattenplazenta	98,2 %	225	AI012433
	EST: human	72,6 %	201	AI094610
136	EST: Rattenplazenta	98,6 %	435	AI012433
	EST: human	73,1 %	368	R33961
140	EST: Maus	96,3 %	216	AA165912
	EST: human (overlap)	83,7 %	104	AA574026
141	EST: Rattenmilz	94,9 %	195	AI180434
145	EST: Ratte	96,1 %	102	AA899899
147	EST: Rattenhirn	98,5 %	205	AI227789
148	EST: Ratte	97,6 %	127	AI072884
152	EST: human	90,7 %	216	AA972339
153	EST: Rattenlunge	99,4 %	523	AI010103
155	EST: Ratte	98 %	198	AI030970
157	EST: Rattenmilz	99,1 %	334	AA80147
	EST: hum.Ovarkrebs	93,1 %	333	AA160116
158	EST: Ratte	99,1 %	348	AA818065
159	EST: Rattenmuskel	98,4 %	244	AI171651
	EST: hum. Pankreas	74,2 %	186	AA129796
165	EST: Rattenmuskel 3`	100 %	475	AI171651
	EST: hum. Pankreas	85,4 %	219	AA128485
166	EST: human, exakte Überlappung	94,8 %	58	AA721354

3.2 70 - 90% Homologie zu ESTs

Klon	Homologie zu	Homologie	Länge in bp	Accessionsnummer
41	EST: Maus	83,7 %	399	AA174529
42	EST: mur.Brustdrüse	72,9 %	192	AA880279
46	EST: murine Ektoplacent EST: human	87,8 % 71,9 %	417 452	AA408682 H64584
50	EST: rat muscle EST: human pancreas	89,9 % 68,2 %	178 192	AI171651 AA128485
51	EST: Rattenmuskel	83,9 %	205	T82960
52	EST: human	80,1 %	266	AA824189
58	EST: murMacrophage	79,9 %	224	AI174624
102	EST: Ratte EST: human	96,6 % 67,5 %	146 405	AA996697 AI092571
106	EST: Mausembryo	87,4 %	159	W77605
115	EST: Rattenmilz	85,5 %	179	AI0142167
117	EST: Maus	81,1 %	185	AA212890
119	EST: Maus	80,2 %	101	AA563349
128	EST: Mausthymus	75,7 %	202	W91613
133	EST: hum.Brustdrüse	85,2 %	142	AI156764
134	EST: hum. Embryo	79,4 %	262	AA330741
135	EST: Mauslymphkn.	80 %	145	AA265837
137	EST: human	79,3 %	179	AA668788
143	EST: Ratte	83,1 %	189	AI073205
154	EST: Mausembryo EST: human	87,1 % 78,4 %	171 139	AA408682 H64584
156	EST: hum. Herz	85 %	286	W61184
160	EST: human	73,1 %	368	Z33571
162	EST: Ratte	85,9 %	177	AI137346

3.3 < 70% Homologie zu ESTs

Klon	Homologie zu
53	EST: no signifikant match
54	EST: no signifikant match
55	EST: no signifikant match
56	EST: no signifikant match
86	EST: no signifikant match
95	EST: no signifikant match
104	EST: no signifikant match
121	EST: no signifikant match
124	EST: no signifikant match
126	EST: no signifikant match
138	EST: no signifikant match
139	EST: no signifikant match
144	EST: no signifikant match
146	EST: no signifikant match
151	EST: no signifikant match
163	EST: no signifikant match
164	EST: no signifikant match
167	EST: no signifikant match

Die beiden folgenden Tabellen stellen eine Kurzfassung der Tabelle 5 dar. Sie unterteilen die Gene in zwei Gruppen. Die erste Gruppe zeigt eine Homologie von mehr als 70 % zu bereits beschriebenen Genen, die zweite Gruppe von unter 70 % Homologie repräsentiert neue Gene (*Novels*). Die Sequenzen dieser neuen cDNA-Fragmente wurden mit Teilsequenzen von Genen (ESTs) in den Datenbanken, verglichen. Bei diesen *expressed sequence tags* handelt es sich um kurze (mehrere 100 bp lange) Fragmente, die aus Expressionsbibliotheken verschiedener Systeme isoliert wurden. Zusätzliche Information wird erhalten, wenn hier cDNA-Fragmente der ML-SSH Homologie zu ESTs aus Tumorzellen, bzw. Tumoren zeigen. Da es sich bei diesen ESTs in erster Linie um humane Sequenzfragmente handelt, können auch Aussagen über die Homologie zur humanen Sequenz gemacht werden. Bei einer Homologie von mehr als 85 % könnte sich das aus der ML-Bank identifizierte cDNA-Fragment für Expressionsstudien in humanen Tumoren eignen. Die neuen Sequenzen wurden nach ihrem Homologiegrad zu ESTs nochmals unterteilt.

Datenbank-Analyse (*Blast*-Vergleichsmodus)

für alle 162 individuellen Gene (Vergleich mit bekannten Genen)

Homologie zu bekannten Genen	> 90 %	70-90%	< 70 %
Anzahl der Gene	61 (38%)	22 (13%)	79 (49%)

für die 79 Sequenzen mit einer Homologie < 70% zu bekannten Sequenzen (Vergleich mit ESTs)

Homologie zu ESTs	> 90 %	70-90%	< 70 %
Anzahl der Gene	39 (49%)	22 (28%)	18 (23%)

Tabelle 6. Überblick über die Datenbank-Analyse der identifizierten Sequenzen. Die Gruppierung erfolgte gemäß der Einteilung in Tabelle 5. Die beiden Tabellen stellen das Ergebnis der vergleichenden Sequenzanalyse mit humanen und Nagersequenzen der öffentlichen Datenbanken (NCBI, einschließlich aller nicht-redundanten Genbanken: GenBank+EMBL+DDBJ+PDB-Sequenzen, sowie DDBJ-Est-Division) dar und werden im Text näher erläutert.

Die Datenbankanalyse (Tab. 6) ergab, daß 61 Klone (38 %) der ML-Subtraktion bereits beschriebene Gene repräsentieren (> 90 % Homologie zu den bekannten Genen), 22 Klone (13 %) zeigen Homologien von 70 - 90 % mit bereits bekannten Sequenzen von Mensch, bzw. Maus oder zu Rattengen. In dem Falle der großen Sequenzähnlichkeit zu anderen Arten könnte es sich um neue Rattenhomologe zu diesen Sequenzen handeln; bei der nicht völligen Übereinstimmung zu publizierten Rattensequenzen etwa um neue Mitglieder bereits bekannter Familien von Rattengen. 79 (49 %) der isolierten Gene sind neue Gene (*Novels*), da sie weniger als 70 % Homologie zu beschriebenen Genen zeigen. Während 39 dieser Gene signifikante Homologie (> 90 %) zu den ESTs der Datenbanken aufweisen, besteht bei 22 weiteren Genen mittelmäßige bis geringe Homologie (70 - 90 %) und bei 18 cDNA-Fragmenten überhaupt keine Übereinstimmung in den Datenbanken.

Die als metastasierungsassoziiert identifizierten Gene kodieren für Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Entsprechend ihrer Lokalisation in der Zelle konnten membranassoziierte Proteine identifiziert werden wie CD24, *Metastasis-associated* Faktor, KS 1/4-Antigen oder nukleäre Proteine wie TBP-assoziiertes Faktor 170, DOB (hn RNP), mirf 6, B23, p62 (dok) oder TFII. Es wurden Mitglieder von Signaltransduktionskaskaden wie c-Met, die Tyrosinphosphatase PRL-1 oder die Phospholipase A mit ihrem Aktivator plap identifiziert, sowie die Ca⁺⁺-bindenden Proteine Thrombospondin, Oncomodulin und Calmodulin. Proteine, die bei der Adhäsion eine Rolle spielen, wie ZO-1, Connexin und

Plakophilin wurden ebenso identifiziert, wie solche, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, wie α -Tropomyosin, β -Tubulin, Aktin und die Zytokeratine 7, 8 und 19. Auch in Transkription und Translation involvierte Proteine wie Cholinkinase, tob und EF-2 oder die DNA Polymerase A und einige ribosomale Proteine zeigten sich als differenziell exprimiert. Sowohl Zytokine wie TGF α und MPF (*Megakaryocyte potentiating factor*), als auch Transportproteine wie AP 47 (Clathrin-assoziiert) waren hochreguliert. Interessant ist auch die Isolierung von IAP, einem Inhibitor der Apoptose, als metastasierungsassoziiertes Gen, sowie von EKER (*intracisternal A-Partikel*), einem endogenen Retrovirus-artigen mobilen Element, das durch Insertion in Gene deren Leseraster verändern kann. Eine Reihe der differenziell exprimierten Genen spielt vor allem beim Metabolismus der Zelle eine Rolle

Identität	Referenz
c-Met	Di Renzo et al., 1995
Cathepsin H	Sivaparvathi et al., 1996
Zytokeratin 7	Wauters et al., 1995
Zytokeratin 8	Yokoyama et al., 1999
Zytokeratin 19	Schoenfeld et al., 1996
<i>Metastasis-associated Factor</i>	Rosel et al., 1998
Oncomodulin	Bernaert et al., 1989
TGF α	Amundadottir et al., 1998
IAP	LaCasse et al., 1998
CD24 (HSA)	Aigner et al., 1998
B23	Kondo et al., 1997
EKER	Kobayashi et al., 1995
Cholinkinase	Hernandez-Alcoceba et al., 1997
KS 1/4 antigen (KSA)	Bang et al., 1994
MPF (<i>Megakaryocyte potentiating Faktor</i>)	Kojima et al., 1995
SSAT	Manni et al., 1995
Ezrin	Lamb et al., 1997
Thrombospondin*	Bleuel et al., 1999
FABP*	Celis et al., 1996

* bei diesem Gen wurde eine erniedrigte Expression im Zusammenhang mit Krebs beschrieben.

Tabelle 7. Auflistung der in der Literatur bereits als tumorassoziiert beschriebenen Gene. Unter den 162 metastasierungs-assoziierten Genen dieser Subtraktion befanden sich 19, deren Expression oder Funktion im Zusammenhang mit der Tumorprogression bereits bekannt ist.

und ist vermutlich sekundär, als Folge von Ereignissen wie Proliferation, Migration, Intra- und Extravasation hochreguliert (SSAT, PRPP II, HRPT (= IMP), NADP-abh. Isozitatdehydrogenase, Glutaminsynthetase, PDK3, O-Azetyl-GD3-Gangliosid-Synthetase, Golgin 245 und Carboxylesterase). Ebenfalls in der Subtraktion isoliert wurden mitochondriale Gene wie Zytochromoxidasen und das Zytochrom B.

Unter den identifizierten Genen der Subtraktion ML (Tabelle 5) befindet sich eine Anzahl von Genen, welche in der Literatur bereits als tumorprogressions-assoziiert beschrieben wurden (Tabelle 7).

4 Bestätigung der differentiellen Expression durch *Northern-Blot-Analyse*

Die differentiell exprimierten Sequenzen unter den 1985 isolierten Klonen der Subtraktion wurden über *Reverse-Northern-Blots* bestimmt (s. Abb. 8). Anhand von 4 Klonen konnte im Rahmen einer ersten Kontrolle durch eine *Northern-Blot-Analyse* gezeigt werden, daß die Art der Nachselektion sehr wahrscheinlich zuverlässig funktioniert hat. Um dies weiter zu erhärten, wurden weitere 30 cDNA-Fragmente sowohl bekannter, als auch neuer Gene ausgewählt und in *Northern-Blot-Analysen* auf Expression in den beiden Tumorzelllinien getestet. Ein Beispiel für 11 solcher *Northern-Blot-Analysen* ist in Abb. 10 gezeigt.

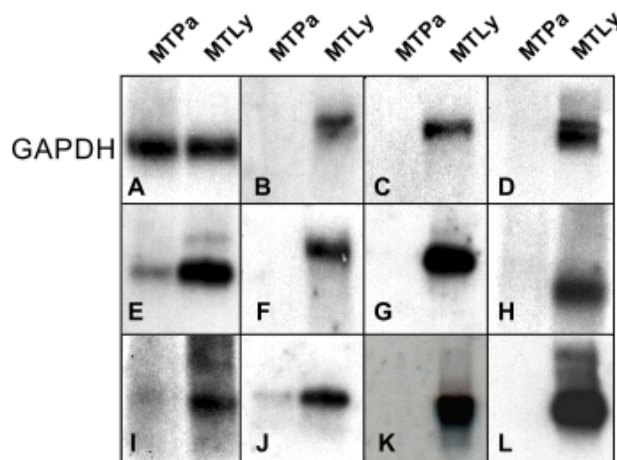


Abb. 10 Northern-Blot-Analyse einiger als positiv identifizierter Klone der Subtraktion. Jede Spur wurde mit 2 µg Poly (A)⁺ RNA von MTLy bzw. MTPa beladen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit ³²P-radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Expositionszeit betrug je nach Signalstärke und gleicher Behandlung eine Nacht (hoch exprimierte Gene) bis zu einer Woche (schwach exprimierte Gene). Die Membranen wurden mit den Test-cDNAs (B-L) hybridisiert, sowie mit GAPDH (A), welches als Ladekontrolle diente. Der Schlüssel für B-L lautet wie folgt: (B) HB2, (C) mirf 6; (D) *Novel 56*; (E) B23; (F) IQGAP2; (G) *Novel 163*; (H) *Novel 154*; (I) *Novel 155*; (J) *Novel 159*; (K) *Novel 160*; (L) *Novel 162*.

Das Ergebnis dieser Analyse war, daß 28 von 30 untersuchten Genen ein spezifisches Signal mit der RNA des Testers MTLY zeigten. Die meisten der überprüften Klone wurden ausschließlich in der metastatischen Zelllinie MTLY exprimiert (B, C, D, G, H, K, L, Abb. 10). Das Expressionsmuster von E, I und J (Abb. 10) macht jedoch klar, daß durchaus auch Gene isoliert werden konnten, welche eine schwache Expression in der nicht metastatischen MTPa-Linie zeigen, in MTLY aber drastisch hochreguliert sind.

Bei den in Abb. 10 dargestellten *Northern-Blot*-Analysen variierten die Expositionszeiten von einer Nacht bis zu einer Woche, bis ein Signal deutlich zu erkennen war. Unter Berücksichtigung der Expositionszeiten von Autoradiogrammen, die bis zur Detektion eines Signals benötigt werden, ist es möglich, Vermutungen über die Transkriptionsmenge der einzelnen Gene anzustellen. So scheinen die Klone B (HB2) und C (mirf 6) schwach, Klon L (*Novel* 162) hoch abundante Sequenzen darzustellen. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die SSH zur Identifikation von schwach und hoch abundanten Transkripten führt.

5 Expressionsstudie der metastasierungsassoziierten Gene in anderen Tumorprogressionssystemen

Im Prinzip durchlaufen metastasierende Tumorzellen unabhängig von ihrem Gewebsursprung ähnliche Schritte (s. Einleitung). Es ist daher wahrscheinlich, daß einige der hier als metastasierungsassoziiert in Mammakarzinomen identifizierten Gene auch in metastatischen Zellen anderer Tumortypen hochreguliert sind. Dies wurde für einige Gene der ML-Bank in verschiedenen Tumorsystemen getestet.

5.1 Verwendete Modellsysteme

Für diese Analyse wurden ausschließlich Systeme gewählt, die sich aus mindestens zwei Zelllinien zusammensetzen, von denen eine nicht metastasierend ist, aber einen Primärtumor verursacht, die andere hingegen ein aggressives invasives Verhalten zeigt.

Das 13762NF-System, in welchem die Subtraktion durchgeführt wurde, besteht aus mehreren isogenen Zelllinien unterschiedlicher metastatischer Kapazität (s. Ergebnisse, Abschnitt 1). Alle 5 Zelllinien, welche auf ihre metastatischen Eigenschaften hin überprüft wurden (Tab. 8), wurden auf Expression von Genen der ML-Bank getestet. Von dem

pankreatischen Adenokarzinom-Zellsystem BSp73 (Matzku *et al.*, 1983) wurde die nicht metastasierende Linie BSp73-1AS und zwei Linien mit ansteigender metastatischer Kapazität (BSP73-10AS und -ASML) getestet. Nach subkutaner Injektion bildet BSp-1AS primäre Tumore, metastasiert aber nicht, wohingegen 10-AS-Zellen intermediär und BSp-ASML-Zellen stark metastasierend sind. Sie besiedeln zunächst die Lymphknoten und vor allem die BSp-ASML-Zellen später die Lunge. Die Brustkrebszelllinien NM081 und MT450 (Kim, 1986) entstanden durch chemisch induzierte Karzinogenese in immungeschwächten W/Fu-Ratten. NM081-Zellen metastasieren nicht im Gegensatz zu den MT450-Zellen. Das Prostatakarzinomsystem (Isaacs *et al.*, 1986) setzt sich aus verschiedenen Tumorzelllinien mit unterschiedlichen *in vivo*-Metastasierungseigenschaften zusammen. Während die G-Sublinie überhaupt nicht metastasiert, verursachen die Linien AT-1, AT-3, MatLu und MatLyLu Metastasen, bevorzugt in der Lunge.

Durch lange Kultivierung von Zelllinien kann es zur Veränderung von Eigenschaften, wie des metastatischen Verhaltens, kommen. Daher wurde das in der Literatur beschriebene metastatische Verhalten der Zelllinien in unserem Institut nochmals überprüft (J. Sleeman). Es entsprach dem in der Literatur beschriebenen.

System	Zelllinie	Primär-tumor	Tiere mit LN-Mets	Tiere mit LU-Mets
Brusttumor-Zelllinien	NM081	8/8	0/8	0/8
	MT450	8/8	8/8	8/8
Pankreastumor-Zelllinien	1 AS	8/8	0/8	0/8
	10 AS	8/8	7/8	1/8
	ASML	8/8	7/8	5/8
Prostatatumor-Zelllinien	G subline	8/8	0/8	0/8
	AT-1	8/8	2/8	6/8
	AT-3	8/8	1/8	7/8
	MatLu	8/8	2/8	7/8
	MatLyLu	8/8	4/8	6/8

Tabelle 8. Überprüfung des metastatischen Potentials verschiedener Rattenzelllinien *in vivo* durch subkutane Injektion. Eine Gesamtzahl von 5×10^5 Zellen in PBS wurde s.c. in die Flanke eines jeden Tieres injiziert. Für diese Untersuchungen wurden 8 Tiere pro Zelllinie eingesetzt. Die Tiere wurden so lange am Leben gelassen, bis der Primärtumor die durch das deutsche Gesetz erlaubte Größe erreicht hatte oder Anzeichen von Leiden zu erkennen waren. Bei der Obduktion wurden die Tier auf primäre und sekundäre Tumoren (Metastasen) hin untersucht. Während alle Zelllinien einen Primärtumor verursachten, zeigte jeweils eine Zelllinie pro Gruppe kein metastatisches Verhalten. LN = Lymphknoten, LU = Lunge, Mets = Metastasen. Die Daten dieser Tabelle wurden freundlicherweise von Dr. Jonathan Sleeman zur Verfügung gestellt.

In einigen der Hybridisierungen wurde auch RNA aus zwei menschlichen Mammakarzinomzelllinien aufgetragen. Die beiden verwendeten Zelllinien, MDA-MB-231 und -468 (Caillaue *et al.*, 1974; Cailleau *et al.*, 1978) wurden aus epithelialen Adenokarzinomen zweier Brustkrebspatientinnen kloniert und verhielten sich in Versuchen mit Nacktmäusen und in einem modifizierten CAM-Assay invasiv (Zhang *et al.*, 1991; Hendrix *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). Kreuzhybridisierung von Ratten-cDNAs aus der ML-SSH unter stringenten Bedingungen mit diesen humanen Zelllinien würde zeigen, daß die entsprechende Probe für eine Analyse menschlichen Tumormaterials geeignet ist.

Für die *Northern-Blot*-Analyse mit RNAs der verschiedenen Tumorzelllinien wurden als Sonden 17 Gene der ML-Bank ausgewählt. Sieben dieser Gene sind bereits im Zusammenhang mit Tumorprogression beschrieben worden (Tab. 7). Zusätzlich wurden 4 weitere bekannte Gene eingesetzt, die allerdings noch nicht mit Krebs in Verbindung gebracht worden waren. Sechs der untersuchten cDNA-Fragmente stellen noch unbekannte Gene dar.

Die RNAs der Zelllinien wurden innerhalb ihrer Gruppe nach ihrem metastatischen Potential geordnet (grafisch dargestellt durch ein Dreieck im oberen Teil der entsprechenden Abbildungen, "metastatisches Potential"). Da sich das 13762NF-System aus verschiedenen Zelllinien mit ansteigender metastatischer Kapazität zusammensetzt, kann man wichtige Informationen aus der Korrelation der Expression eines untersuchten Gens mit dem metastatischen Potential der Tumorzelllinien gewinnen. Es wird deutlich, ob ein Gen bereits bei schwach metastasierenden Zellen genauso stark exprimiert wird, wie bei stark metastatischen Zellen. Soweit die Ergebnisse aus diesem System auf die allgemeine Situation übertragbar wären, würde dieses Gen generell während der Metastasierung überexprimiert werden. Eine andere Möglichkeit ist, daß die Expression eines Gens entsprechend des metastatischen Potentials der Zelllinien ansteigt. Dann könnte es sich um ein Gen handeln, dessen Expression in Bezug zum Grad der Metastasierung steht.

5.2 Zusammenhang zwischen Expression bereits identifizierter Gene und metastatischem Potential von Zelllinien

Bei den 11 bereits identifizierten Genen, die in den Tumorprogressionssystemen auf Expressionsebene untersucht wurden, handelt es sich teilweise um Gene, deren Überexpression in Tumoren, bzw. Tumorzelllinien schon länger bekannt ist (CD24, Oncomodulin) oder die aus Tumoren oder Tumorzelllinien isoliert (MPF, *Metastasis associated factor*), bzw. funktionell in Zusammenhang mit Tumorgenese (B23, Kondo et

al., 1997) gebracht wurden. Da in zahlreichen Publikationen eine verringerte Expression des Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin bei der Tumorbildung beschrieben wurde (z.B. Bleuel *et al.*, 1999), war es interessant, die Expression dieses hier als metastasierungsspezifisch identifizierten Gens in verschiedenen Systemen zu untersuchen.

Vier der bereits bekannten Gene wurden noch nicht im Zusammenhang mit Tumorgenese beschrieben (S7, HB2, mirf 6, IQGAP2).

Bei **CD24** handelt es sich um ein GPI-Molekül, welches als differenzierungsspezifisches Protein während der Reifung von B- und T-Lymphozyten auftritt (Fischer *et al.*, 1990; Pirruccello *et al.*, 1986). Eine erhöhte Expression von CD24 wurde bei einer Reihe von Krebserkrankungen gefunden (Droz *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1992; Akashi *et al.*, 1994). CD24 zeigte die beste Korrelation von erhöhter Expression mit zunehmender metastatischer Kapazität der Zelllinien von allen 17 untersuchten Genen (s. Abb. 11).

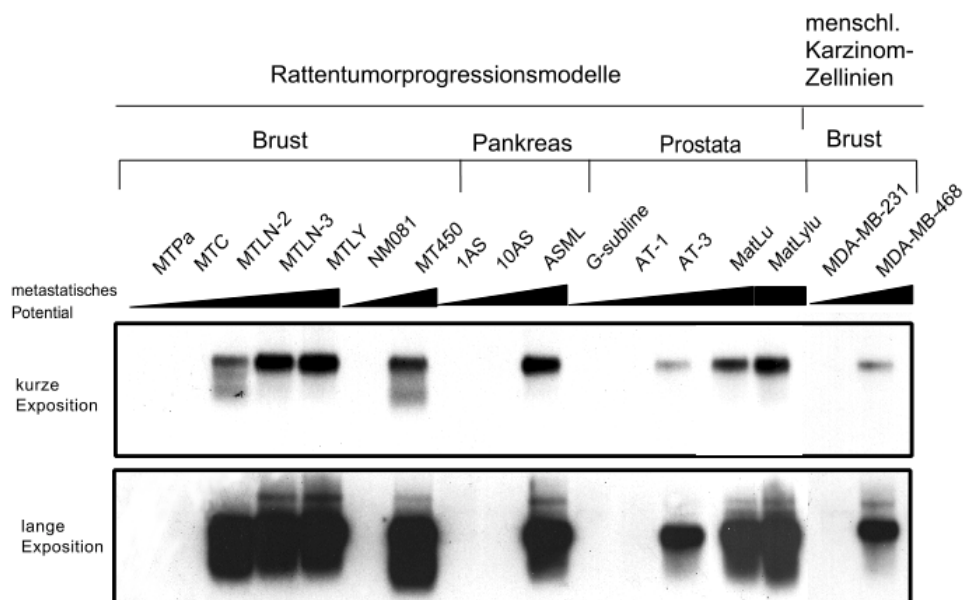


Abb. 11 Korrelative CD24-Expressionsstudie.

Northern-Blot-Analyse von CD24 in 4 verschiedenen Rattentumorsystemen. Mit Ausnahme des NM081/MT450-Paars und der beiden humanen Karzinomzelllinien, sind alle anderen Systeme aus klonalen Zelllinien zusammengesetzt, die sich in ihren metastatischen Eigenschaften unterscheiden. Hier wurden sie innerhalb des jeweiligen Systems ihres metastatischen Potentials entsprechend gruppiert. Hybridisierung und Waschschritte erfolgten unter stringenten Bedingungen (65°C). Jede Spur wurde mit 2 µg Poly (A)⁺ der entsprechenden Zelllinie beladen.

Besonders deutlich ist diese Korrelation der Expression mit zunehmendem metastatischen Potential in den Zelllinien im 13762NF-System. In der nicht metastasierenden Linie MTPa und der schwach metastatischen Linie MTC wird CD24 nicht exprimiert. Die Expression

von CD24 steigt mit dem metastatischen Potential der anderen 3 Linien des 13762NF-Systems an. Auch in den weiteren 3 Systemen besteht eine signifikante Korrelation der Expression mit dem ansteigenden metastatischen Potential der einzelnen Zelllinien. Keine der nicht oder schwach metastatischen Zelllinien zeigt ein Signal, auch nicht bei Überexposition des Autoradiogramms. Darüberhinaus kann man ein deutliches Signal in der humanen Brusttumorzelllinie MDA-MB-468 detektieren.

Die Hauptaufgabe des **ribosomalen Proteins S7** ist die korrekte Faltung der 16S-RNA (Wimberley et al., 1997). Über eine mögliche Rolle von S7 bei der Tumorprogression ist nichts bekannt. Unter den hier durchgeführten Bedingungen war nach Hybridisierung mit S7 früher als mit den anderen Genen ein Signal zu detektieren. Das Autoradiogramm des in Abb.12 dargestellten *Northern-Blots* wurde nur 2 Stunden lang exponiert (die Autoradiogramme der anderen Gene mehrere Stunden bis eine Woche).

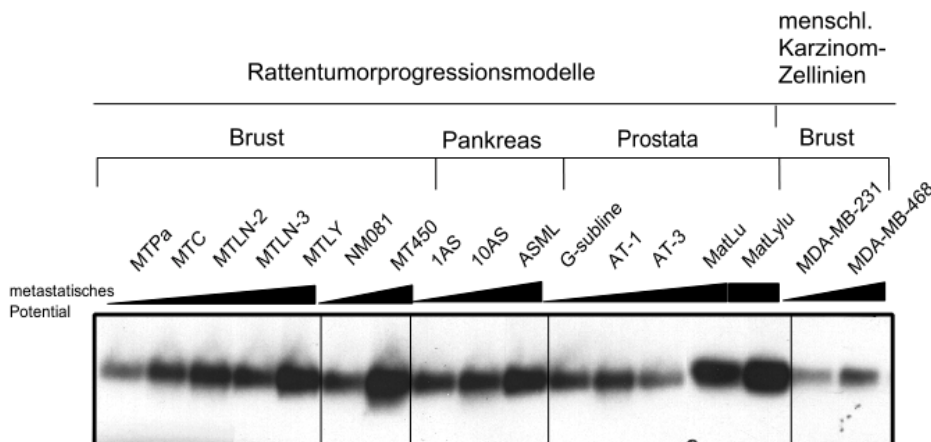


Abb.12 Korrelative S7-Expressionsstudie. Die Legende dieser *Northern-Blot*-Analyse entspricht der in Abb. 11

In allen untersuchten Tumorprogressionsmodellen der Ratte wird S7 am stärksten in den metastasierenden Linien exprimiert. Im Gegensatz zu CD24 zeigten auch die tumorigenen, jedoch nicht metastasierenden Linien der jeweiligen Systeme eine schwache Expression. In beiden humanen Tumorzelllinien sind ebenfalls deutlich Banden zu erkennen. Im 13762NF-System und im pankreatischen BSp73-System korreliert der Anstieg der Expression direkt mit dem metastatischen Potential. Im Prostatamodell findet man eine starke Expression von S7 erst in den stark metastasierenden Linien MatLu und MatLyLu.

Ergebnisse

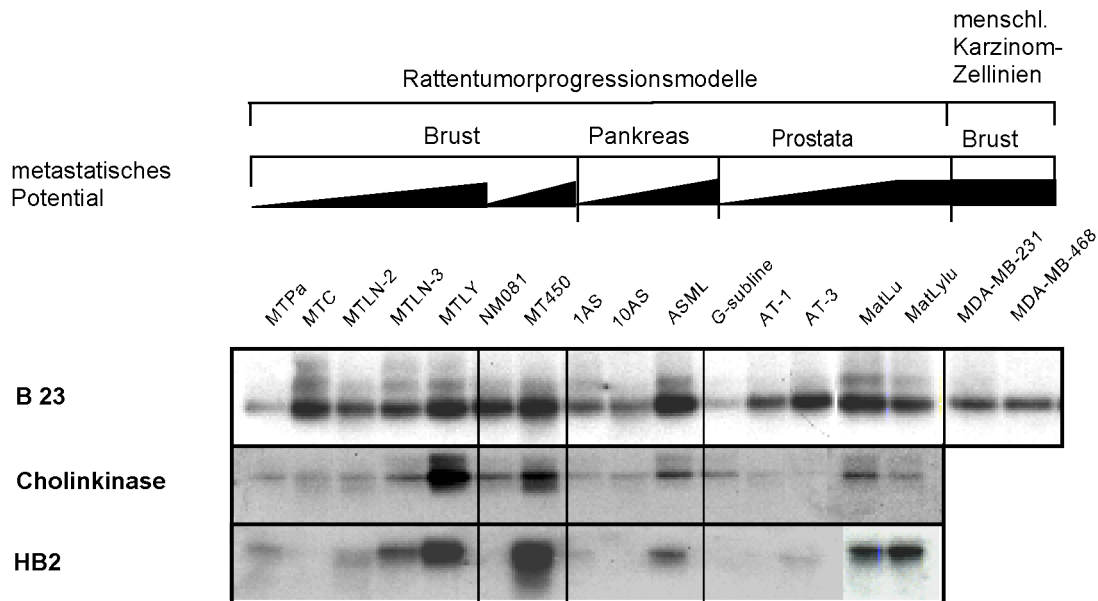


Abb. 13 Korrelation der Expression von B23, Cholin kinase und HB2 mit dem metastatischen Potential in verschiedenen Tumorprogressionssystem (Northern-Blot-Analyse). Mit Ausnahme des NM081/MT450-Paars und der humanen Mammakarzinomzelllinien sind alle anderen Systeme aus klonalen Zelllinien zusammengesetzt, die sich in ihren metastatischen Eigenschaften unterscheiden. Hier wurden sie innerhalb des jeweiligen Systems ihres metastatischen Potentials entsprechend gruppiert. Hybridisierung und Waschschriffe erfolgten unter stringenten Bedingungen (65°C). Jede Spur wurde mit 2 µg Poly (A)⁺ der entsprechenden Zelllinie beladen.

B23 (NPM, Nucleophosmin, Numatrin) ist ein Inhibitor des Tumorsuppressorproteins IRF-1 (Kondo *et al.*, 1997) und könnte deshalb Einfluß auf die Tumorentwicklung haben. Es ist in allen 4 Tumorprogressionsmodellen hauptsächlich in den metastatischen Zelllinien exprimiert (Abb. 13). In jedem System ist eine schwache Expression in nicht metastatischen Zelllinien zu finden. Im 13762NF- und im Prostata-System ist B23 in den schwach metastasierenden Zelllinien bereits genauso stark exprimiert wie in den intermediär oder stark metastasierenden Zelllinien. In den beiden humanen Mammakarzinomzelllinien waren ebenfalls Banden zu detektieren.

Eine erhöhte Aktivität des Zellzykluspromotors **Cholin kinase** wurde bereits in humanen Brusttumorzelllinien beschrieben (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997). In jedem der 4 untersuchten Systeme wird Cholin kinase in den stark metastasierenden Zelllinien exprimiert. Alle nicht metastasierenden Zelllinien zeigen eine sehr schwache Expression. Im Gegensatz zu B23 wird Cholin kinase in den schwach und intermediär metastasierenden Zelllinien nicht verstärkt exprimiert (Abb.13).

HB2 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Adhäsion und wurde im Zusammenhang mit Herzerkrankungen beschrieben (Matsumoto *et al.*, 1997). In allen 4 Systemen findet man hohe Expression von HB2 in den stark metastasierenden Linien. Das Expressionsmuster ist dem von Cholinase sehr ähnlich; auch HB2 wird nicht, bis sehr schwach in den nicht metastasierenden Zelllinien exprimiert (Abb. 13).

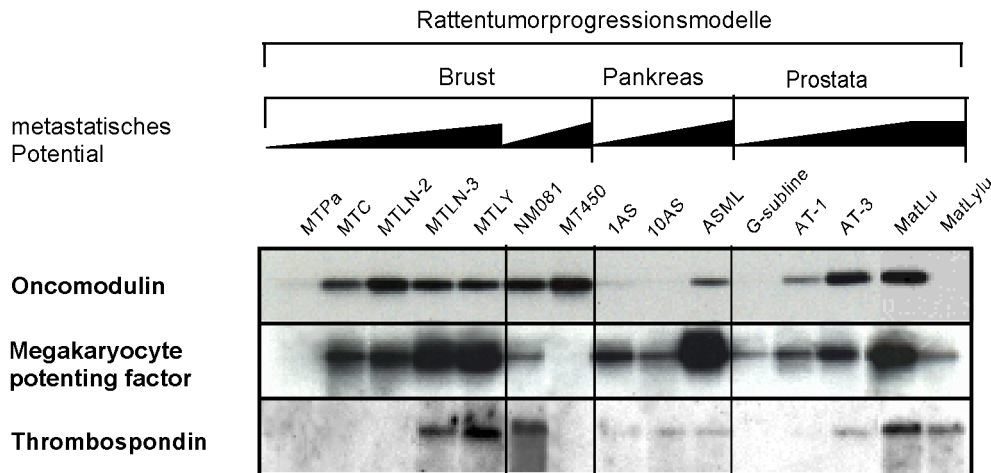


Abb. 14 Korrelation der Expression von Oncomodulin, *Megakaryocyte potentiating* Faktor und Thrombospondin mit dem metastatischen Potential in verschiedenen Tumorprogressionssystemen. Die Legende dieser *Northern-Blot*-Analyse entspricht der in Abb.13.

Eine Überexpression des Ca^{++} -bindenden Proteins **Oncomodulin** in extraembryonalem Gewebe (Plazenta) und einer Anzahl von Tumoren ist bereits beschrieben worden (Bernaert *et al.*, 1989). Auch die Expression von Oncomodulin korreliert in allen 4 Systemen mit dem metastatischen Potential der Zelllinien. Mit Ausnahme von NM081 zeigt keine der nicht metastatischen Linien ein Signal. Wie B23 wird Oncomodulin in den schwach, intermediär und stark metastasierenden Linien des 13762NF-Systems gleichermaßen stark exprimiert. Oncomodulin wird nicht in der MatLyLu-Linie exprimiert (Abb. 14).

Das Zytokin **MPF** (*Megakaryocyte potentiating factor*), wurde erstmals in einer humanen Pankreastumorzelllinie identifiziert (Kojima *et al.*, 1995) und ist differenziell in den metastatischen Linien des 13762NF-, sowie des Prostata- und des Pankreassystems exprimiert. Wie Oncomodulin und B23 wird MPF im 13762NF-System in allen metastasierenden Linien stark exprimiert, in den beiden stark metastasierenden Zelllinien sogar doppelt so hoch wie in den beiden schwächer metastasierenden (Abb. 14).

Thrombospondin, ein Inhibitor der Angiogenese, wurde bislang in nicht metastatischen Systemen im Vergleich zu metastatischen als überexprimiert beschrieben (z.B. Bleuel *et al.*, 1999). Im 13762NF-System, wie auch im Prostata-System wird Thrombospondin ausschließlich in den metastatischen Zelllinien exprimiert. Im Pankreas-Modell steigt die schwache Expression nur um das Doppelte in der invasiven ASML-Linie an, während in dem Brusttumorpaar eine Expression nur in der nicht metastatischen Linie zu beobachten ist (Abb. 14).

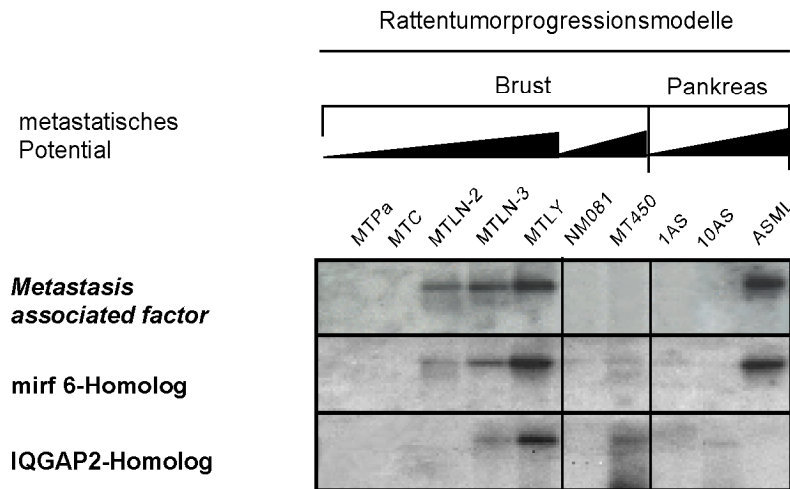


Abb. 15 Korrelation der Expression von *Metastasis associated* Faktor, der Homologe von mirf 6 und IQGAP2 mit dem metastatischen Potential in zwei Rattentumorprogressionsmodellen. Die Legende dieser Northern-Blot-Analyse entspricht der in Abb. 13

Das **Mirf-6-Homolog** zeigt 83%ige Homologie zum Transkriptionsfaktor mirf 6 (*mouse interferon regulatory* Faktor 6) und könnte das neu identifizierte Rattenhomolog darstellen. Sein Expressionsmuster entspricht weitgehend dem des **Metastasis associated Faktors**, einem GPI-verankerten Protein, welches in einem Pankreastumor der Ratte identifiziert wurde (Rosel *et al.*, 1998). Beide werden im 13762NF- und im Pankreas-BSp-73-System nur in den relativ stark metastasierenden Zelllinien exprimiert (Abb. 15).

IQGAP2 ist ein *ras*/GAP-verwandtes Protein und interagiert mit dem ebenfalls isolierten Calmodulin (Brill *et al.*, 1996). Das in der Subtraktion identifizierte cDNA-Fragment weist 78% Homologie zum bekannten humanen Gen auf und könnte somit das neue Rattenhomolog darstellen. Die Northern-Blot-Analyse zeigte eine differenzielle Expression des IQGAP2-Homologs in den beiden Brusttumormodellen, wobei nur die stark metastasierenden Zelllinien signifikante Signale lieferten (Abb. 15).

Gene, welche eine Korrelation der Expression mit dem metastatischen Potential in allen 4 Systemen zeigten, waren CD24, S7, B23, Oncomodulin und HB2. Bei CD24, S7 und B23 waren zusätzlich Banden in den humanen Mammakarzinomzelllinien zu detektieren. Gene, welche deutlich differenziell exprimiert wurden, aber nicht in allen Systemen, waren Cholinase, *Megakaryocyte potentiating* Faktor (MPF), *Metastasis associated* Faktor, Thrombospondin und die Homologe von mirf 6 und IQGAP2.

5.3 Zusammenhang zwischen Expression bisher unbekannter Gene und dem metastatischem Potential von Zelllinien

Unter den bisher unbekannt Gensequenzen der ML-Bank wurden willkürlich 6 ausgewählt und deren Expression in den 4 Tumorprogressionssysteme untersucht. Weiterhin wurde getestet, ob diese Gene ein Signal in den beiden humanen Mammakarzinomzelllinien zeigten.

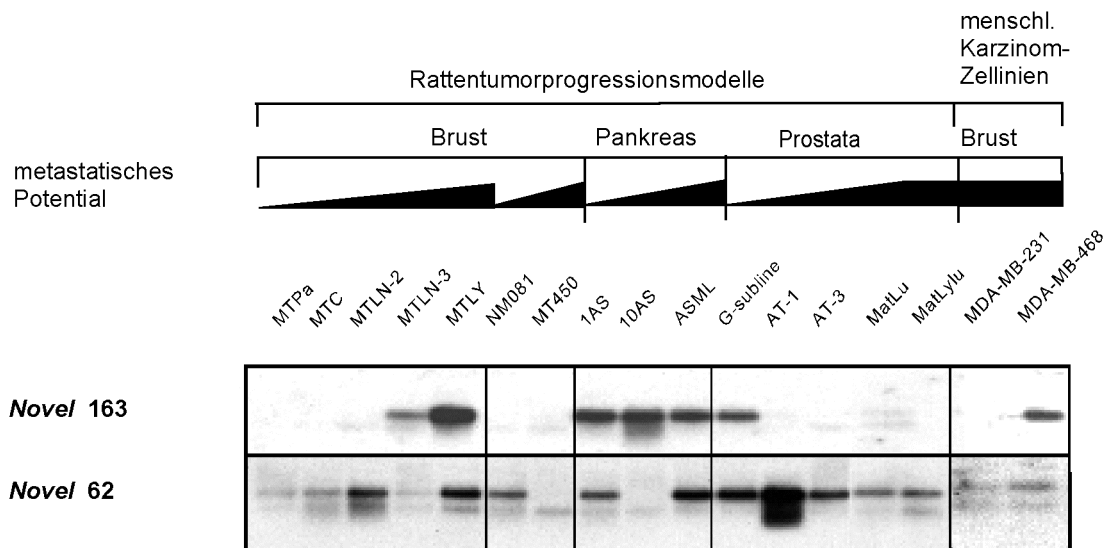


Abb. 16 Korrelation der Expression der neuen Gene *Novel 163* und *62* mit metastatischer Kapazität in verschiedenen Tumorprogressionssystemen (*Northern-Blot-Analyse*). Mit Ausnahme des NM081/MT450-Paars und der humanen Mammakarzinomzelllinien sind alle anderen Systeme aus klonalen Zelllinien zusammengesetzt, die sich in ihren metastatischen Eigenschaften unterscheiden. Hier wurden sie innerhalb des jeweiligen Systems ihres metastatischen Potentials entsprechend gruppiert. Hybridisierung und Waschschritte erfolgten unter stringenten Bedingungen (65°C). Jede Spur wurde mit 2 µg Poly (A)⁺ der entsprechenden Zelllinie beladen.

Das Gen *Novel 163* wird nur im 13762NF-Brust-Adenokarzinomssystem differenziell exprimiert. Es ist nicht, bzw. kaum in den nicht, bzw. schwach metastasierenden Zelllinien

exprimiert; die Expression steigt allerdings von der stark (MTLN-3) zur sehr stark metastasierenden Linie MTLY deutlich an. Keine Expression ist im zweiten untersuchten Brusttumorsystem zu detektieren. Im Prostatasystem besteht eine umgekehrte Korrelation, d. h. *Novel 163* ist ausschließlich in der nicht metastasierenden G-Sublinie exprimiert. Die humanen MDA-MB-468-Zelllinie zeigt ein detektierbares Signal (Abb. 16).

Auch das Rattengen *Novel 62* zeigt eine Kreuzreaktion mit dem humanen Homolog. Es wird in 3 Systemen verstärkt in metastasierenden Zelllinien exprimiert (Abb. 16). Allerdings ist das Expressionsprofil nicht ganz einheitlich, denn nicht alle dieser metastasierenden Linien exprimieren *Novel 62* höher als die nicht metastasierenden Zelllinien der jeweiligen Systeme. Im zweiten Brusttumorsystem wird *Novel 62* nur in der NM081-Linie, also der nicht metastasierenden Zelllinie exprimiert.

Die bisher verwendeten neuen Gensequenzen zeigen eine Kreuzhybridisierung mit humanen Zelllinien unter stringenten Bedingungen. Die im Folgenden untersuchten Gene zeigten nur in den Rattentumorsystemen detektierbare Signale.

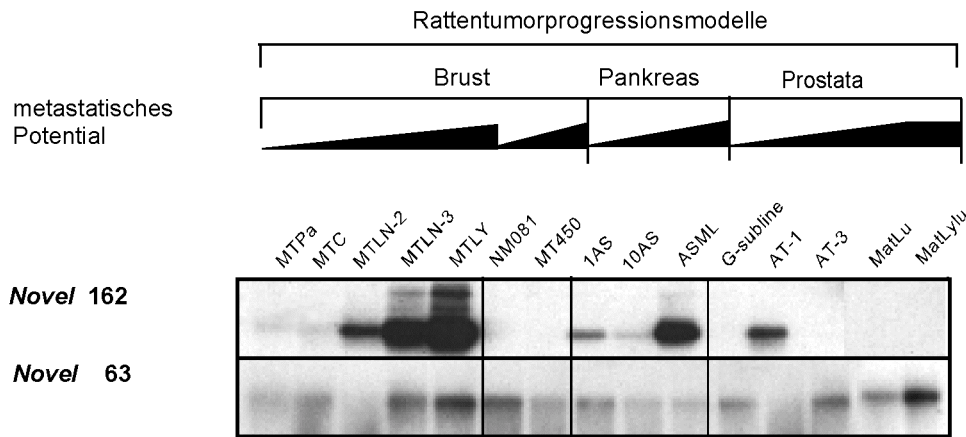


Abb.17 Korrelation der Expression der neuen Gene *Novel 162* und *63* mit metastatischer Kapazität (*Northern-Blot-Analyse*) in 4 verschiedenen Rattentumorprogressionsystemen. Die Legende dieser Abbildung entspricht der in Abb. 16.

Das Gen *Novel 162* ist im 13762NF-Brust-Adenokarzinomsystem und im BSp73-System verstärkt in den metastasierenden Zelllinien exprimiert (Abb. 17). Mit Zunahme des metastatischen Potentials der Zelllinien im 13762NF-System findet man auch zunehmend stärkere Expression. Im Prostatasystem läßt sich eine Expression von *Novel 162* nur in der schwach metastasierenden AT-1-Linie nachweisen. Bei den anderen 3 metastasierenden Prostata-Zelllinien, sowie der nicht metastasierenden G-Sublinie ist keine Expression zu detektieren. In dem NM081/MT450-Paar wird *Novel 162* nicht exprimiert.

Bei **Novel 63** handelt es sich um ein schwach abundantes neues Gentranskript, das erst nach einwöchiger Exposition des Autoradiogramms zu detektieren war. Eine erhöhte Expression von **Novel 63** zeigen das 13762NF- und das Prostatasystem in den meisten ihrer metastatischen Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen nicht metastatischen Linien. In den anderen beiden Systemen zeigt sich keine erhöhte Expression in den metastasierenden Zelllinien (Abb. 17).

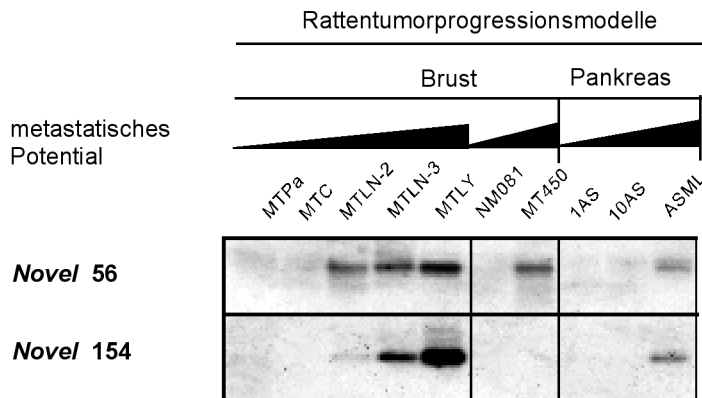


Abb.18 Korrelation der Expression der neuen Gene **Novel 56** und **154** mit metastatischer Kapazität (*Northern-Blot-Analyse*) in 2 bzw. 3 verschiedenen Rattentumorprogressionssystemen. Die Legende dieser Abbildung entspricht der in Abb. 16.

Das Gen **Novel 56** wird in 3 Systemen (Brustsysteme und Pankreassystem) differenziell exprimiert, mit ausschließlicher Expression in den metastasierenden Zelllinien. Im 13762NF-Brust-Adenokarzinomsystem steigt die Expression direkt mit Zunahme des metastatischen Potentials an (Abb. 18).

Die Expression von **Novel 154** korreliert in 2 Systemen mit dem metastatischen Potential. Eine erhöhte Expression von **Novel 154** im 13762NF-Brustsystem ist direkt mit einem Anstieg der metastatischen Kapazität der jeweiligen Zelllinien verbunden. Im Pankreassystem wird es ausschließlich in der stark metastasierenden ASML-Linie exprimiert (Abb. 18).

Diese 6 untersuchten neuen Gene zeigten ein mit dem metastatischen Potential korrelierendes Expressionsverhalten im 13762NF-Brust-Adenokarzinomsystem, 5 dieser Gene auch in anderen Tumorprogressionsmodellen.

Alle 17 für diese Expressionsstudie ausgewählten Gene zeigen in dem für die Subtraktion verwendeten 13762NF-Brust-Adenokarzinomsystem eine differenzielle Expression in den metastasierenden Zelllinien. Dieses System setzt sich aus genetisch eng verwandten Zelllinien mit unterschiedlichem metastatischen Potential zusammen. Im 13762NF-Systeme werden einige der untersuchten Gene in schwach metastasierenden Zellen bereits genauso hoch exprimiert, wie in stark metastasierenden Zellen. Die Expression anderer Gene steigt direkt mit dem metastatischen Potential der Zelllinien des 13762NF-Systems an. Sechs der analysierten Gene werden in allen 4 verwendeten Tumorprogressionssystemen differenziell exprimiert, 4 Gene in drei dieser Systeme und 6 Gene in 2 Systemen. Nur ein Gen, *Novel 163*, wird ausschließlich im Ausgangssystem exprimiert. Bis auf dieses Gen und IQGAP2 werden alle anderen 15 Gene in Tumorprogressionssystemen verschiedener Organe exprimiert. 5 der untersuchten Gene zeigten Kreuzhybridisierung mit humanen Adenokarzinomzelllinien unter stringenten Bedingungen. Gene dieser Gruppe können für weitere Untersuchungen in humanen Tumoren ausgewählt werden. 7 der 11 eingesetzten bekannten Gene sind in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Tumorprogression beschrieben worden (s. auch Tabelle 7). Eine Übersicht über die differenzielle Expression der 17 Gene in den Tumorprogressionsmodellen ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Gen	Differenzielle Expression in Tumorprogressionsmodellen		Kreuzhybridisierung mit human Linien	Tumorass in Literatur
	Anzahl	Gewebe		
CD 24	4	Brust, Pankreas, Prostata	X	X
S7	4	Brust, Pankreas, Prostata	X	-
B23	4	Brust, Pankreas, Prostata	X	X
Cholinkinase	4	Brust, Pankreas, Prostata	-	X
HB2	4	Brust, Pankreas, Prostata	-	-
Oncomodulin	4	Brust, Pankreas, Prostata	-	X
MPF	3	Brust, Pankreas, Prostata	-	X
<i>Novel 62</i>	3	Brust, Pankreas, Prostata	X	-
<i>Novel 162</i>	3	Brust, Pankreas, Prostata	-	-
<i>Novel 56</i>	3	Brust, Pankreas	-	-
Thrombospondin	2	Brust, Prostata	-	X
Met.acces. Faktor	2	Brust, Pankreas	-	X
mirf6-Homolog	2	Brust, Pankreas	-	-
IQGAP2-Homolog	2	Brust	-	-
<i>Novel 63</i>	2	Brust, Prostata	-	-
<i>Novel 154</i>	2	Brust, Pankreas	-	-
<i>Novel 163</i>	1	Brust	X	-

Tabelle 9. Übersicht über die differenzielle Expression der 17 untersuchten Gene in den 4 Ratten-Tumorprogressionssystemen, mit Angabe über eine Kreuzhybridisierung mit humanen Brusttumorzelllinien unter stringenten Bedingungen. Die Spalte "Tumorass. in Literatur" gibt darüber Auskunft, ob dieses Gen in der Literatur bereits als tumorprogressionsassoziiert beschrieben wurde. S. auch Tabelle 7.

6 CD24 und S7 als potentielle Marker in humanen Tumoren

Die Differenzanalyse wurde in einem Adenokarzinom-Zellsystem der Ratte durchgeführt. Expressionsstudien in verschiedenen Tumorprogressionssystemen der Ratte zeigten, daß alle analysierten Gene spezifisch in den metastasierenden Zelllinien einiger oder aller Systeme exprimiert werden. Zur Beantwortung der Frage, wie relevant diese Gene für die Entwicklung humaner Tumore sind, ist es notwendig herauszufinden, welche der Gene homologe Entsprechungen im Sinne von detektierbaren Banden bei Kreuzhybridisierungen in humanen Systemen haben und ob sie in humanen Tumoren spezifisch in den Tumorzellen exprimiert sind. Eine Reihe von Genen, die in humanen Zellen kreuzhybridisierten, wurde bereits identifiziert (voriges Kapitel). Von diesen wurden zwei, CD24 und S7, für Expressionsstudien in humanen Tumoren ausgewählt. Für diese Studien wurden primäre Tumore der Brust und des Kolorektums (Dickdarm) verwendet.

6.1 Expressionstudien von S7 in menschlichen Tumoren durch *Northern-Blot-Analyse*

Die Hybridisierung von S7 mit mRNA (Abb. 12) zeigte, daß seine Expression in Tumorzellen sehr hoch ist (s.o.). Deshalb eignet sich S7 für eine Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus menschlichen Tumoren. Die Isolation von Poly(A)⁺ RNA für die *Northern-Blot-Analyse* aus Tumoren ist schwierig, da üblicherweise eine Isolation nur weniger µg Poly(A)⁺ RNA aus Operationsmaterial möglich ist und die Untersuchungsmöglichkeiten dadurch limitiert sind.

Abb. 19 zeigt eine *Northern-Blot-Analyse*, welche mit einer RNA-Membran (Invitrogen) durchgeführt wurde. Sie enthält die Gesamt-RNA (jeweils 20 µg) eines Tumors und des korrespondierenden Normalgewebes 5 unterschiedlicher Patienten. Dabei handelt es sich um 4 primäre Tumore des Kolorektums und einen Primärtumor der Brust. In allen 5 untersuchten Fällen war die Expression von S7 im Tumor im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe signifikant erhöht. Die Kolontumore exprimierten S7 im Vergleich zu den dazugehörigen Normalgeweben 3-6 mal höher. Im Brusttumor wurde S7 dreimal höher exprimiert als im Normalgewebe.

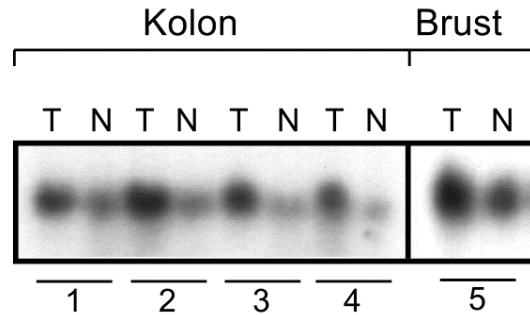


Abb. 19 Untersuchung der Expression von S7 in humanen Tumoren und korrespondierendem Normalgewebe. Northern-Blot-Analyse von S7 in Tumor- und jeweils korrespondierendem Normalgewebe von 5 Patienten (4mal Kolon (Dickdarm) und einmal Brust). Die Analyse wurde mit Hilfe von RNA-Membranen vorgenommen (Invitrogen). Jede Spur enthält 20 µg Gesamt-RNA. Die Hybridisierung erfolgte unter nicht stringenten Bedingungen (49°C bei Hybridisierung und Waschschrritten). Bei jedem Patient war die Expression von S7 im Tumor-, verglichen mit dem Normalgewebe, signifikant erhöht.

Auch in humanen Tumoren findet man eine tumorspezifische Expression von S7. Eine eingehendere Untersuchung der Expression von S7 wurde auf Paraffinschnitten menschlicher Tumore mit Hilfe der *in-Situ*-Hybridisierungs-(ISH)-Technik durchgeführt. Der Vorteil gegenüber einer Northern-Blot-Analyse ist, daß direkt gezeigt werden kann, welcher Zelltyp das untersuchte Gen exprimiert. Für die Northern-Blot-Analyse verwendet man hingegen RNA, die aus dem heterogenem Tumorgewebe präpariert wurde.

6.2 Expressionsstudien von CD24 und S7 in menschlichen Tumoren durch *in-situ*-Hybridisierung

Die *in-Situ*-Hybridisierungen wurden auf Paraffinschnitten menschlicher Karzinome durchgeführt. Bei den Tumoren handelt es sich um intraduktale Karzinome der Brust und des Dickdarms (Kolon). Darunter versteht man Karzinome, die sich im Inneren von Gängen (Dukti) gebildet haben, und sich dadurch auszeichnen, daß das normalerweise einschichtige Epithel mehrschichtig und unregelmäßig geworden ist. Diese intraduktalen Karzinome sind eingebettet in normales Stromagewebe.

Die intraduktalen Brustkarzinome stammen von 4 verschiedenen Patientinnen und die 3 intraduktalen kolorektalen Karzinome von ebenfalls 3 verschiedenen Patienten (detailliertere Beschreibung in Tabelle 10). Um einen direkten Zusammenhang zur Metastasierung untersuchen zu können, wurden nur Karzinome verwendet, welche bereits Metastasen

verursacht hatten. Bei einem Brustkarzinom wurde zusätzlich zum Primärtumor eine Lymphknotenmetastase untersucht. Es wurden sowohl radioaktive, als auch nicht radioaktive *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt.

Da beide Gene mit der RNA der humanen Karzinomzelllinien gleichermaßen hybridisierten, wie mit der RNA der Rattentumorzelllinien, konnten die Rattensequenzen für die Untersuchungen in humanen Tumoren eingesetzt werden. Zuvor wurden die cDNA-Fragmente von CD24 und S7, die bei der Subtraktion identifiziert wurden, in einen bidirektionalen Vektor (pGEMT-easy, Promega) umkloniert und *sense*- und *antisense*-RNA aus diesen Ratten-cDNA-Fragmenten durch *in-vitro*-Transkription hergestellt. An aufeinanderfolgenden Tumorschnitten wurde dann die Hybridisierung mit *antisense*- und zur Kontrolle *sense*- RNA durchgeführt.

Karzinom-Gewebetyp	Beschreibung	Nummer	Klassifikation	Alter w/m
Brust	invasives, niedrig differenziertes duktales Karzinom	5922/99	G-2; PT-2	47w
Lymphknotenmetastase	s.o.	5922/99	s.o.	s.o
Brust	invasives, niedrig differenziertes duktales Karzinom	67820/98	PT-1C;G-3; NB-1,R-0,L-1	40 w
Brust	invasives, mitteldifferenziertes duktales Karzinom(fokal intraduktal)	68336/97	G-2; PT-2	41 w
Brust	invasives, mitteldifferenziertes duktales Karzinom	68647/97	G-2; PT-2	53w
Kolorektum	invasives, mitteldifferenziertes, tubuläres Adenokarzinom	80613/97	G-2;PT-4B;PL-1; PN-2;PM-1;PR-X	56 w
Kolorektum	invasives,überw. mitteldifferenziertes,tubuläres fokal niedrig dif. Adenokarzinom	80183/97	G-3; PT-3C; PN-1; PM-X; PR-0	57 m
Kolorektum	invasives, mitteldifferenziertes, tubuläres Adenokarzinom mit Lymphgefäßeinbrüchen + multiplen Metastasen	88401/97	G-2;PT-3C; PL-1;PN-0, PM-1,PR-X	68 w

Tabelle 10 Übersicht und Klassifizierung der untersuchten Karzinome

Die Klassifizierung erfolgte in der Pathologie Graz gemäß den UICC-Richtlinien der Tumorklassifikation (Holzner et al., 1994). Alle Karzinom hatten bereits Metastasen verursacht. Alle Karzinomproben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Kurt Zatloukal, Pathologie der Universität Graz, bereitgestellt.

6.2.1 Expression von CD24 in menschlichen Tumoren

Das Resultat der Hybridisierungsreaktion von CD24 mit einem invasiven, mitteldifferenzierten, tubulären Adenokarzinom des Kolorektums (Nr. 88401/97, s. Tabelle 10) ist in Abb. 20 dargestellt. Auf dem linken Teil (a) wurde mit *sense*-RNA und auf dem rechten (b) mit *antisense*-RNA hybridisiert. Der Gewebeschnitt enthält sowohl normale Gänge, welche mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet sind, als auch solche, in denen sich ein intraduktales Karzinom gebildet hat (jeweils im Querschnitt). In allen 3 untersuchten kolorektalen Karzinomen war die Expression von CD24 hoch abundant, mit Lokalisation im Zytoplasma der Tumorzellen. Eine basale Expression von CD24 war schwach in der normalen kolorektalen Mukosa zu detektieren.

Die ISH von CD24 auf einem invasiven, mitteldifferenzierten, duktalem Mammakarzinom (Nr. 68336/97, s. Tabelle 10) ist ebenfalls in Abb. 20 dargestellt. Auf der linken Seite (c) ist die Hybridisierung mit *sense*-RNA und auf der rechten Seite (d) mit *antisense*-RNA dargestellt. Intraduktale Brustkarzinome sind durch mehrschichtiges Epithel und unregelmäßige Formen gekennzeichnet. Im Unterschied zu kolorektalen Tumoren kann man hier die Expression in normalem und Tumor-Gewebe nicht auf dem gleichen Schnitt vergleichen. Bei dem in Abb. 20 untersuchten intraduktalen Karzinom waren bereits alle Drüsengänge im Gewebeschnitt verändert. In allen 4 untersuchten intraduktalen Brustkarzinomen konnte CD24-Expression in den Tumorzellen mit zytoplasmatischer Lokalisation nachgewiesen werden. Die umgebenden Stromazellen zeigten keine CD24-Expression.

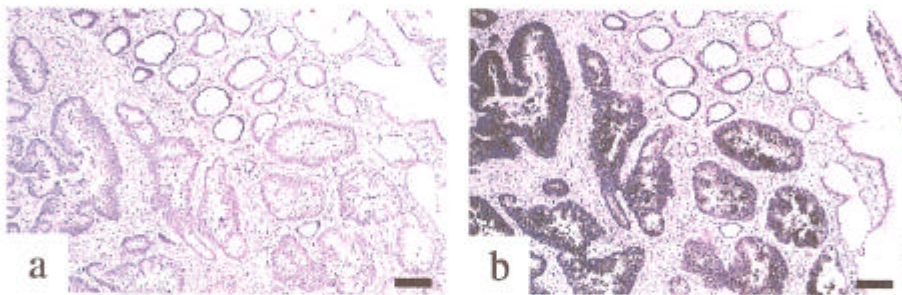
Die *In-situ*-Hybridisierungen haben gezeigt, daß CD24 stark im Zytoplasma der Tumorzellen der intraduktalen Karzinome der Brust und des Kolorektums exprimiert wird. Die *sense*-Kontrolle der jeweiligen Hybridisierungen zeigte kein Signal. Dadurch wird bestätigt, daß die abgebildeten Signale mit der *antisense*-RNA spezifisch für die Expression in den Tumorzellen sind.

Abb. 20 *In-situ*-Hybridisierung von CD24 in einem humanen intraduktalen Karzinom des Kolorektums (a und b) und der Brust (c und d).

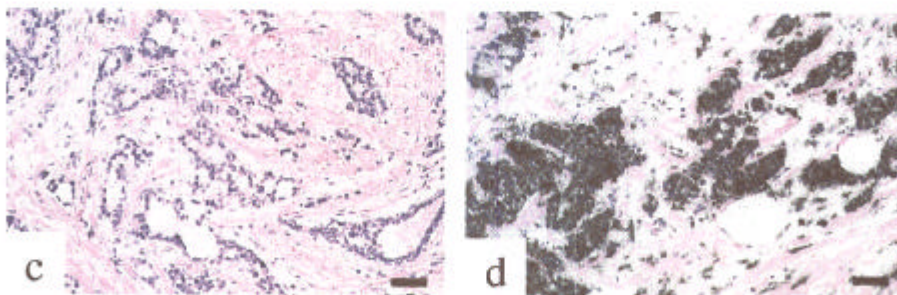
Expression von CD24 in einem invasiven, mitteldifferenzierten, tubulären Adenokarzinom des Kolorektums mit Lymphgefäßeinbrüchen und multiplen Metastasen (a und b; 88401/97, Tab. 10), sowie in einem invasiven, mitteldifferenzierten, duktalem Karzinom der Brust, fokal mit intraduktalen Anteilen (c und d; 68336/97, Tab. 10). *In-situ*-Hybridisierung von 6 µm dicken Schnitten Formaldehyd-fixierter und in Paraffin eingebetteter humaner Karzinomproben mit ³⁵S-UTP-markierter *sense* (a bzw. c) und *antisense*-RNA (b bzw. d) der Ratte. Nach einer Expositionszeit von einer Woche wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (H/E) gegengefärbt. Die schwarzen Balken stehen für 100 µm (a und b), bzw. 40 µm (c und d).

Expressionsstudien von CD24 in humanen Karzinomen

Kolorektales Karzinom



Mammakarzinom



6.2.2 Expression von S7 in menschlichen Tumoren

Die Expression von S7 in menschlichen Tumoren wurde durch *in situ*-Hybridisierung der Rattensequenz auf Paraffinschnitten von Mamma- und Kolorektalen Karzinomen durchgeführt.

Die Hybridisierungsreaktion von S7 auf einem invasiven, mitteldifferenzierten, tubulären Adenokarzinom des Kolorektums (Nr. 80613/97, Tabelle 10) ist in Abb. 21 dargestellt. Im linken Teil (a) wurde mit *sense*-RNA und im rechten (b) mit *antisense*-RNA hybridisiert. In allen 3 untersuchten kolorektalen Karzinomen war die Expression von S7 in den intraduktalen Anteilen sehr hoch. Bei stärkerer Vergrößerung konnte sie in den Nukleoli der Tumorzellen lokalisiert werden. In den nicht neoplastischen Epithelien der normalen Gänge war S7 nur sehr schwach zu detektieren. Eine erhöhte Expression als Folge starker Proliferation konnte ausgeschlossen werden, da die hochproliferativen Mukosa-Zellen keine verstärkte S7-Expression aufweisen. Auf dem Gewebeschnitt sind normale Gänge (einschichtiges Epithel) und Gänge mit intraduktalen Karzinomen (mehrschichtiges, unregelmäßiges Epithel) zu erkennen (jeweils im Querschnitt).

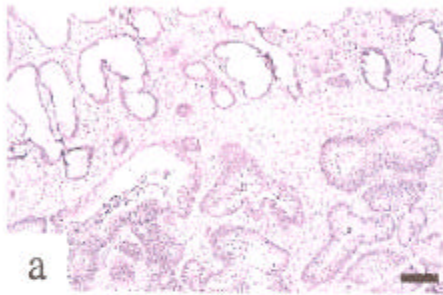
Auch in den intraduktalen Karzinomzellen der Brust wird S7 in hoher Rate in den Nukleoli exprimiert. Dies ist besonders deutlich in der stark vergrößerten Abbildung des intraduktalen Karzinoms (Nr. 67820, Tabelle 10 ;Abb. 21) dargestellt. Im linken Teil (c) wurde mit *sense*-RNA und im rechten (d) mit *antisense*-RNA hybridisiert. Die umgebenden Stromazellen zeigen nur vereinzelt Expression. Wie schon im Abschnitt über CD24 erläutert, ist es bei Brusttumoren problematisch, vergleichendes Normalgewebe zu untersuchen. Auch bei dem in Abb. 21 untersuchten intraduktalen Karzinom waren nahezu alle Gänge im Gewebeschnitt verändert.

In einem Fall wurde ein Primärtumor der Brust zusammen mit der korrespondierenden Lymphknotenmetastase über ISH analysiert (Nr. 5922/99, Tabelle 10). Sowohl im Primärtumor (nicht gezeigt), als auch in der Metastase (Abb. 21, e *sense*- und f *antisense*-RNA) konnte eine sehr hohe S7-Expression mit Lokalisation in den Nukleoli nachgewiesen werden.

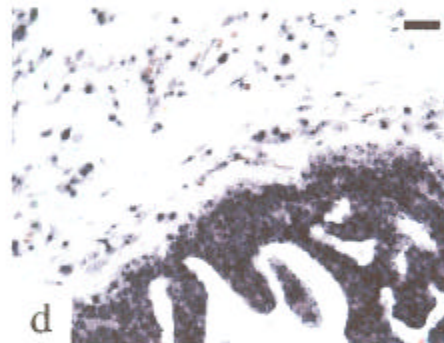
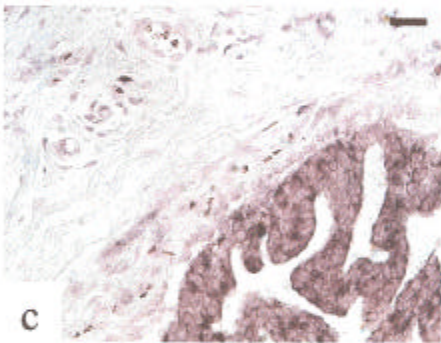
Durch die ISHs konnte gezeigt werden, daß S7 sehr hoch in den Nukleoli der Tumorzellen der intraduktalen Karzinome von Brust und Kolorektum und darüberhinaus in einer Metastase eines Brustkarzinoms exprimiert wird. Da die *sense*-Kontrolle der jeweiligen Hybridisierungen kein Signal zeigt, wird die Spezifität der mit der *antisense*-RNA erhaltenen Signale bestätigt.

Expressionsstudien von S7 in humanen Karzinomen

Kolorektales Karzinom



Mammakarzinom



Lymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms

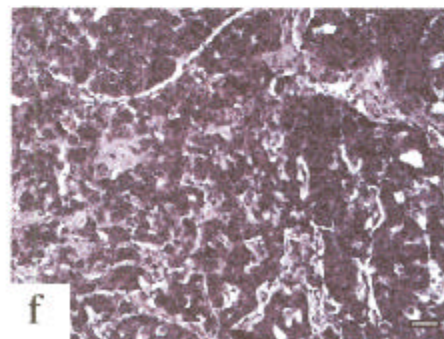
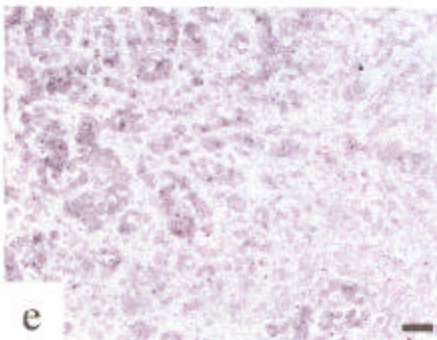


Abb. 21 *In-situ*-Hybridisierung von S7 in einem humanen intraduktalen Karzinomen und einer Lymphknotenmetastase

Expression von S7 in einem invasiven, mitteldifferenzierten, tubulären Adenokarzinom des Kolorektums (a und b, 80613/97, Tabelle 10), in einem invasiven, niedrig differenzierten, duktalem Karzinom der Brust (c und d, 67820, Tab. 10) und in einer Lymphknotenmetastase eines invasiven, niedrigdifferenzierten, duktalem Brustkarzinom der Brust (e und f, 5922/99, Tab. 10). *In-situ*-Hybridisierung von 6 µm dicken Schnitten Formaldehyd-fixierter und in Paraffin eingebetteter humaner Karzinomproben mit ³⁵S-UTP-markierter (a,b), bzw. fluoreszenz-markierter (c,d,e,f) *sense*- und *antisense*-RNA (*sense* RNA: a, c, e; *antisense*-RNA: b, d, f) Nach einer Expositionszeit von einer Woche (radioaktive Markierung), bzw. einer Nacht (FISH) wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (H/E) gegengefärbt. Die schwarzen Balken stehen für 100 µm (a und b), bzw. 40 µm (c und d) und 60 µm (e und f)

Mit der *In-situ*-Hybridisierung wurde bestätigt, daß beide Gene, CD24 und S7 spezifisch in den Tumorzellen der Karzinome exprimiert werden. Damit ist es mit der Differenzanalyse, wie postuliert, gelungen, Tumormarker für humane Karzinome zu identifizieren. Zusätzlich zu CD24, das schon mit Tumorprogression in Zusammenhang gebracht wurde, konnte ein weiteres Gen, S7, bei dem es bisher noch keine Verbindung zur Tumorgenese gab, als neuer Tumormarker identifiziert werden.

7 Expressionsmuster von CD24 und S7 in verschiedenen Rattengeweben

Abschließend sollte noch die Expression der beiden potentiellen Markergene für Metastasierung, CD24 und S7, in verschiedenen Geweben der Ratte untersucht werden, um möglichst umfassende Informationen zu erhalten. Es wurden nicht nur Verdauungs- und Exkretionsorgane, Organe des weiblichen und männlichen Reproduktionstraktes und des Blut- und Lymphsystems untersucht, sondern auch Skelettmuskel, Gehirn, Zunge und Augen miteinbezogen.

7.1 Gewebespezifisches Expressionsmuster von CD24

Expression von CD24 war in fast allen Geweben zu detektieren (Abb. 22). Starke Expression konnte im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Dort ist sie in den Darmabschnitten am stärksten, deutlich auch im Magen und etwas schwächer im Ösophagus. Die lymphatischen Organe Lymphknoten, Thymus und Milz zeigen hingegen nur sehr schwache Expression; in Lymphknoten und der Milz waren sogar erst nach

Ergebnisse

7tägiger Expositionszeit (das Autoradiogramm des in Abb. 22 gezeigten *Northern-Blot* wurde für 14 Stunden exponiert) Banden zu detektieren. In der Blase und im Eierstock ist die Expression schwach. In der Brustdrüse und besonders im Uterus wird CD24 stark exprimiert. Im männlichen Reproduktionstrakt zeigen die Hoden keine Expression, eine sehr hohe Expression war dagegen in Vorhautdrüse und Nebenhoden und vor allem der Prostata zu finden. Auch in der Speicheldrüse wird CD24 stark exprimiert. Die Nebenniere zeigt dagegen kaum detektierbare Expression. Im Normalgewebe der Leber konnte keine Expression von CD24 nachgewiesen werden. Sehr schwach war sie auch bei Gehirn und Herz. In der Lunge und im Skelettmuskel wird CD24 ebenfalls schwach exprimiert. In der Niere, in der Zunge und den Augen wird CD24 hingegen stärker etwas exprimiert.

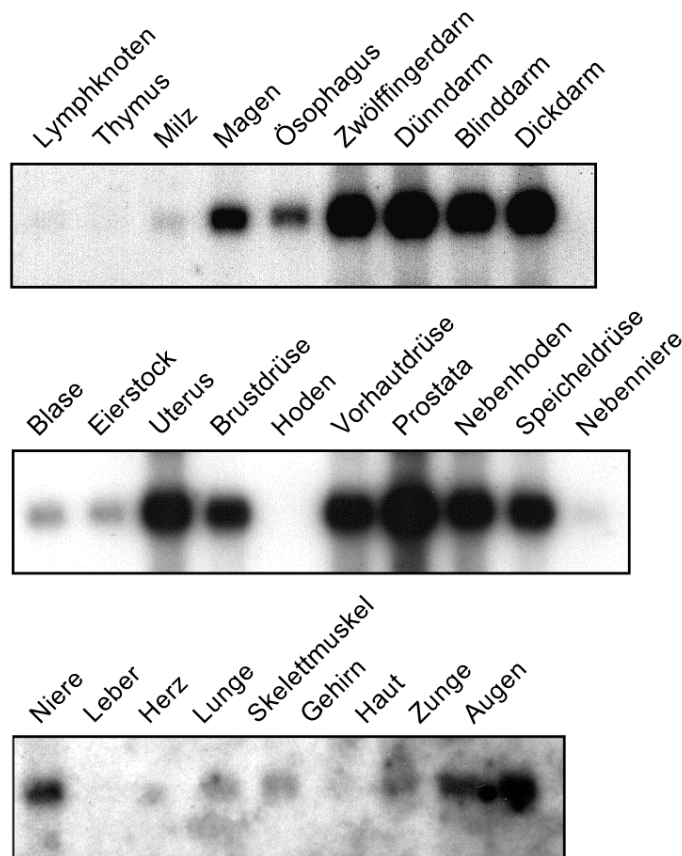


Abb.22 Gewebespezifische Expressionsstudie von CD 24

Northern-Blot-Analyse von verschiedenen Rattengeweben unter stringenten Bedingungen (65°C bei Hybridisierung und Waschschrritten). Jede Spur wurde mit 5 µg Poly (A)⁺ RNA der entsprechenden Zelllinie beladen. Die Expositionszeit betrug 14 Stunden bei -80°C.

7.2 Gewebespezifisches Expressionsmuster von S7

S7-Expression konnte in allen Geweben detektiert werden (Abb. 23). Die Expression in den einzelnen Geweben war im großen und ganzen einheitlicher als bei CD24. In den 3 lymphatischen Organen Lymphknoten, Thymus und Milz wird S7 in hohem Maße exprimiert, im gastrointestinalen Bereich etwas geringer. S7 wird am stärksten im Zwölffinger- und Dünndarm exprimiert. Halb so hoch ist die Expression im Ösophagus und Blinddarm und nochmals geringer in Magen und Dickdarm. S7 wird in der Blase, im Eierstock und Uterus ähnlich hoch transkribiert wie in den lymphatischen Organen. Etwas geringer ist die Expression in der Brustdrüse und im Hoden. Die Vorhautdrüse zeigte eine sehr starke S7-Expression. Stark exprimieren auch die Prostata und die Hoden und in geringerem Maße auch die Nebenhoden. In den Speicheldrüsen und der Nebenniere waren schwache Banden bei Überexposition des Autoradiogramms zu erkennen. Während Niere, Leber, Herz, Skelettmuskel und Augen S7 eher schwach exprimieren, ist die Transkription in Lunge, Gehirn und Zunge etwas höher. Eine recht starke Expression von S7 war in der Haut zu detektieren.

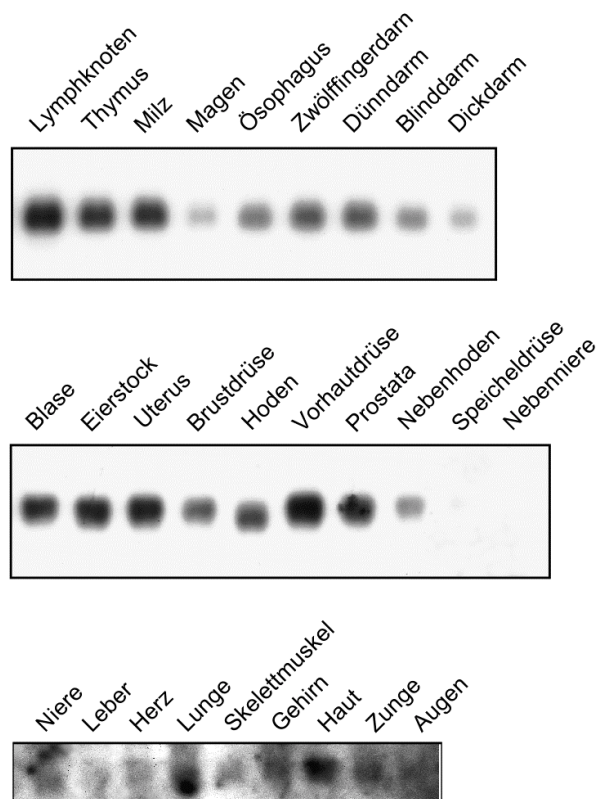


Abb.23 Gewebespezifische Expressionsstudie von S7 Northern-Blot-Analyse von verschiedenen Rattengeweben unter stringenten Bedingungen (65°C bei Hybridisierung und Waschschrinen). Jede Spur wurde mit 5 µg Poly (A)⁺ der entsprechenden Zelllinie beladen

Diskussion

Zur Identifizierung metastasierungsspezifischer Gene wurde eine Differenzanalyse (SSH) zwischen exprimierten Sequenzen zweier Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungsverhalten eines Mamma-Adenokarzinomsystems der Ratte (13762NF; Neri *et al.*, 1982) durchgeführt. Diese Analyse resultierte in der Subtraktionsbibliothek ML (*Mammary carcinoma specific library*). Die Untersuchung von 1985 Klonen der ML-Bank führte zur Identifizierung von 487 metastasierungsspezifischen Sequenzen. Datenbankanalyse und Hybridisierungsstudien engten diese 487 cDNA-Fragmente auf 162 individuelle Gene ein, wobei möglicherweise einige der neuen Sequenzen von gleichen Genen stammen.

Ein Vergleich zweier anderer Zelllinien des 13762NF-Adenokarzinomsystems als der in dieser Arbeit gegenübergestellten MTPa/MTLY-Linien, nämlich MTLn3 als metastasierende und MTC.4 (ein Subklon von MTC) als ihr nicht metastasierender Gegenpart, führte zur Identifizierung von 5 Genen (Pencil *et al.* 1993; Toh *et al.*, 1994; Toh *et al.*, 1995). Die für diese Untersuchungen eingesetzte Technik des *Differential Hybridization Screening* scheint also nur zu Identifikation eines geringen Teils der tatsächlich differenziell exprimierten Gene geführt zu haben. Das wird bestätigt durch den Befund, daß 13 von 17 in diesen beiden Zelllinien analysierten Genen der ML-Bank differenziell zwischen MTLN3 und MTC exprimiert werden.

Für die Differenzanalyse der vorliegenden Arbeit wurde eine andere Methode, SSH (*Suppressive Subtractive Hybridization*, Diatchenko *et al.*, 1996), eingesetzt, die nicht nur die Identifikation einer großen Anzahl, sondern vor allem schwach abundanter Gene ermöglicht. Ohne direkte Kenntnis der Anzahl der Transkripte eines Gens pro Zelle, ist es natürlich schwierig, Folgerungen über die Transkriptionsrate zu ziehen. Unter aller gebotenen Vorsicht ist es möglich, Rückschlüsse über die Abundanz von Gentranskripten zu ziehen, in dem man die Expositionszeiten von Autoradiogrammen aus *Northern-Blot*-Analysen zur Detektion von Signalen ähnlicher Intensität berücksichtigt. S7 schien hierbei das am stärksten transkribierte Gen zu sein, gefolgt von CD24 und Oncomodulin (1-4 Stunden Exposition bis zur Detektion der Signale). Bei Cholinkinase, HB2, MPF und der *Novels* 62, 162, 63 und 163 wurden die Autoradiogramme für 14 Stunden exponiert. Für die Identifizierung anderer Gene wie *Novel* 56, Thrombospondin, Metastasis associated factor, IQGAP2 mußten die Autoradiogramme einige Tage oder sogar eine Woche (IAP, mirf 6-Homolog, *Novel* 154) exponiert werden. Die Transkripte wurden entsprechend als schwach abundant eingestuft.

Eine weitere Methode, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*, Velculescu *et al.*, 1995, s. auch Einleitung) ermöglicht die relativ genaue Bestimmung der Transkriptionsrate. SAGE wird unter Einsatz einer definierten RNA-Menge eines Systems durchgeführt; die Abundanz kann durch Dividieren der Anzahl der erhaltenen Transkripte pro Gen durch die Anzahl aller erhaltenen Transkripte bestimmt werden. Dabei wird von 300.000 Transkripten pro Zelle ausgegangen. Basierend auf einer SAGE-Studie in 5 verschiedenen Systemen (Zhang *et al.*, 1997) wurde ein Vergleich zwischen Transkriptionsrate und bereits vorliegender Identifizierung der entsprechenden Sequenz in den Gendatenbanken durchgeführt. Wie nicht anders zu erwarten war, sind die Gene, welche häufig bis sehr häufig transkribiert werden, fast ausnahmslos bereits sequenziert worden. Interessanterweise stellen diese häufig transkribierten Gene nicht einmal 2 % der gesamten Transkripte einer Zelle dar! Der Großteil der noch unbekannt Genen wird in geringer bis sehr geringer Zahl abgelesen, bzw. die RNA ist sehr instabil und ihre Detektion daher schwierig (Tab. 11).

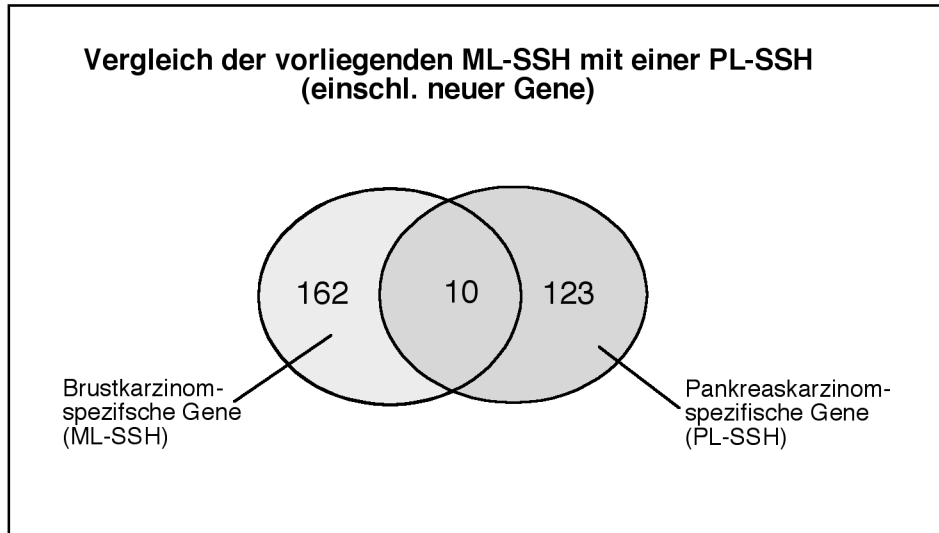
RNA-Transkripte pro Zelle	Anteil	Homologie zu bekannten Sequenzen
> 500	0,1 %	98 %
50 - 500	1,2 %	93 %
5 - 50	12,7 %	68 %
≤ 5	86 %	51 %

Tabelle 11 Abhängigkeit der Sequenzinformation in Datenbanken von der jeweiligen Transkriptionsrate. Die Information in den Datenbanken über die Sequenz eines Genes ist abhängig von der Menge, in der dieses Gen transkribiert wird. Nur ein sehr kleiner Teil der Gene wird in höherer Zahl transkribiert. Diese Gengruppe ist fast vollständig sequenziert. Die meisten Transkripte sind aber in sehr wenigen Kopien vorhanden und dementsprechend schlecht dokumentiert. Diese Berechnung wurde anhand von 300.000 aus 5 Systemen über SAGE analysierter Transkripte vorgenommen, die 48.700 verschiedenen Genen entsprechen (Sensivität bis zu 3 Transkripten pro Gen und Zelle; berechnet nach Zhang *et al.*, 1997, Tabelle 2).

Da die in dieser Arbeit eingesetzte Methode, SSH, zur Anreicherung schwach abundanter Transkripte führt, könnte man schlußfolgern, daß eine Vielzahl noch unbekannter Sequenzen entdeckt werden würde. Dies ist tatsächlich der Fall, denn 49 % der identifizierten Gensequenzen waren bisher noch unbekannt, wobei 18 dieser Sequenzen nicht einmal Homologie zu ESTs der öffentlichen Datenbanken zeigten.

Die Identifizierung einer ähnlich großen Zahl von metastasierungsspezifischen Genen wie hier beschrieben, gelang nur aus einem Pankreasadenokarzinomsystem, ebenfalls mit Hilfe von SSH (v. Stein, Dissertation, 1998). Ein Vergleich auf Sequenzebene der differenziell exprimierten 123 Gene aus dem Pankreasystem mit den 162 Mammakarzinom-spezifischen Genen dieser Arbeit zeigte, daß nur 10 Gene in beiden Systemen identifiziert

wurden (Abb. 24). Das könnte zum einen dahingehend interpretiert werden, daß Brust- und Pankreaskarzinomzellen eher unterschiedliche Subsets von Genen zur Metastasierung rekrutieren. Ein Grund dafür könnte sein, daß im Prinzip ähnliche Funktionen, die zur Metastasierung benötigt werden, von unterschiedlichen Genen oder Gruppen von Genen erbracht werden können. Eine andere Interpretation wäre, daß die Anzahl der Gene, die im Zuge des invasiven Geschehens hochreguliert werden, weit größer ist, als bislang vermutet wurde und die in beiden Karzinomsystemen identifizierten Gene nur einen Teil aller aktivierten Gene repräsentieren. Dafür würde das Ergebnis von Expressionsstudien einiger Gene dieser Mammakarzinom-Subtraktion in dem Pankreaskarzinomsystem sprechen (Ergebnisteil: Abb. 11-18, Tabelle 9). Zwei Drittel der in diesem Zusammenhang untersuchten 17 Gene, welche in der Mamma-, jedoch nicht in der Pankreaskarzinom-spezifischen Subtraktion identifiziert wurden, erwiesen sich als dennoch differenziell exprimiert im Pankreaskarzinomsystem. Das könnte bedeuten, daß diese Gene zwar in der Pankreaskarzinom-spezifischen Subtraktionsbank vorhanden sind, aber daß die Anzahl

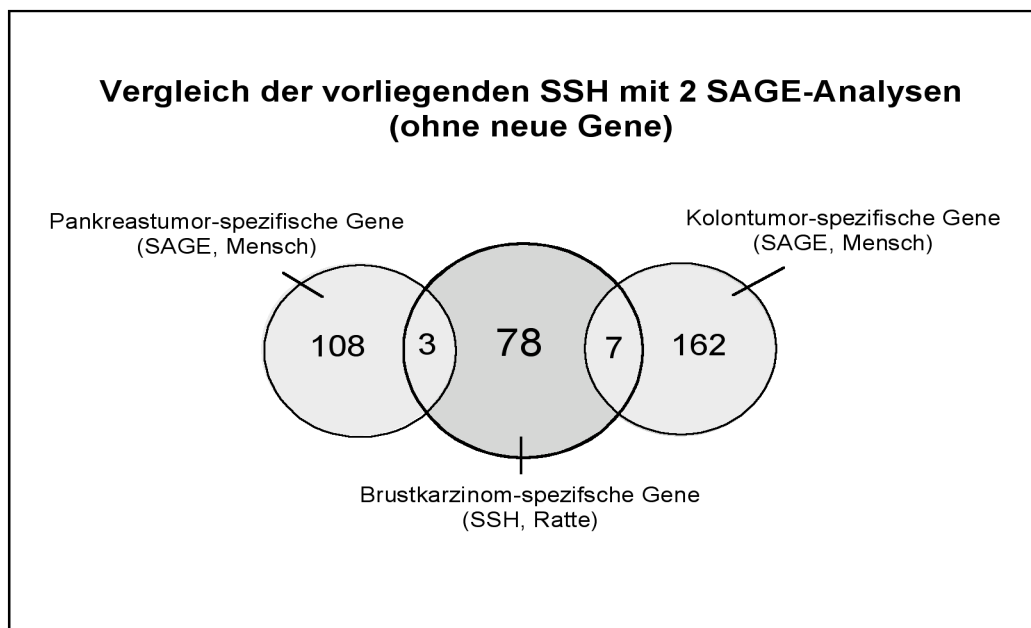


Übereinstimmung	Pankreaskarzinom-spezifische Gene (SSH, Ratte)
Brustkarzinom-spezifische Gene (SSH, Ratte)	c-met Ezrin EKER Zytokeratin 7 Zytokeratin 8 KS 1/4 Antigen O-Acetyl-Gangliosidsynthetase Mitochondriale Cytochrome C Oxidase cytoplasmat. γ -Aktin 28S r RNA Ribosomales Protein L4

Abbildung 24 Vergleich aller identifizierten cDNAs von 2 SSH-Analysen auf Sequenzebene. Mammakarzinomspezifische Library (ML-SSH); Pankreaskarzinomspezifische Library (PL-SSH, Daten entnommen aus v. Stein, Dissertation 1998)

der analysierten Klone (5000) zur Erfassung dieser Gene zu gering war. Dementsprechend sind wahrscheinlich auch die 1985 analysierten Klone, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, nicht ausreichend, um alle metastasierungs-spezifisch aktivierten Gene zu identifizieren. Die Analyse von mehreren 10.000 Klonen der Subtraktionsbibliothek, welche zu einem vollständigeren Bild führen würde, ist jedoch nur durch Automatisierungstechniken möglich (s. S. 91 der Diskussion).

Die bislang einzige weitere derart umfassende Studie wurde nicht im Hinblick auf Invasionsrelevanz durchgeführt (Zhang *et al.*, 1997), so daß ein Vergleich gewisser Vorsicht bedarf. Dennoch soll er hier getätigt werden, um einen besseren, wenn auch nicht vollständigen Einblick über die Gesamtheit der in das Tumorgeschehen involvierten Gene zu bekommen. Diese vergleichende Studie wurde mit Hilfe von SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*; Velculescu *et al.*, 1995, s. Einleitung) durchgeführt und vergleicht die Expression in Pankreas- und Kolontumoren, bzw. in Pankreas- und Kolontumorzellen mit der im normalen Gewebe des Kolons. Ein Vergleich mit den hier identifizierten Genen war nur bei den bekannten Genen möglich, da detaillierte Informationen über die identifizierten neuen ESTs auf der Internetseite (<http://welchlink.welch.jhu.edu>.) nicht zugänglich waren. Drei der 108 Pankreastumor-spezifischen und 7 der Kolontumor-spezifischen Gene wurden auch aus der ML-Bank isoliert. Interessanterweise wurde auch in diesen Pankreastumoren Thrombospondin isoliert, ein Inhibitor der Angiogenese, dessen erhöhte Expression in vielen Veröffentlichungen als ein Zeichen verminderter Tumorprogression und Metastasierung



Übereinstimmung	Pankreastumor-spezif. Gene (SAGE, Mensch)	Kolontumor-spezifische Gene (SAGE, Mensch)
Brustkarzinom-spezifische Gene (SSH, Ratte)	S7 Thrombospondin Zytochrom C Oxidase	B23 S28 EF-2 hn RNP Ubiquitin Zytochrom C Oxidase Mitochondriales Zytochrom B

Abbildung 25. Vergleich mit anderen Differenzanalysen. Übersicht über die Identität der Gene, die in zwei anderen Differenzanalysen identifiziert wurden. Allerdings haben sich die SAGE-Analysen mit rein tumorentstehungs-, aber nicht invasionsrelevanten Genen beschäftigt. Da die Informationen über die unbekanntene Gene (*Novels*, EST-Homologe) der SAGE-Studie auf der Internet-Seite nicht einsehbar waren, erfolgte nur der Vergleich der bekannten Gene. Daten entnommen aus Zhang *et al.* (1997), verändert nach Nestl *et al.* (zur Veröffentlichung eingereicht).

beschrieben wurde (z. B. Bleuel *et al.*, 1999). Die Isolierung von S7 durch SAGE ist der einzige weitere Hinweis auf einen Zusammenhang dieses ribosomalen Gens zu Krebs.

Aufgrund der geringen Übereinstimmung (4 % bzw. 9 %) unter den identifizierten Genen scheint es auf den ersten Blick, daß viele bei der Tumorentstehung aktivierten Gene keine Bedeutung mehr für die Metastasierung haben. Es ist jedoch nicht zwingend notwendig, daß bei der Entwicklung eines lokalen zu einem invasiven Karzinom ein völlig anderer Satz von Genen exprimiert wird. Es ist naheliegender, daß die meisten bei der Tumorentstehung überexprimierten Gene angeschaltet bleiben und weitere hinzukommen, die zusätzliche, metastasierungsrelevante Eigenschaften besitzen. Das könnte darauf hindeuten, daß mindestens einige hundert Gene in das Geschehen der Tumorgenese und Metastasierung involviert sind und diese Zahl somit weitaus höher liegt, als bislang vermutet wurde. Die Identifikation des gesamten Spektrums metastasierungsassoziierter Gene ist aber nur durch zahlreiche Differenzanalysen in unterschiedlichen Systemen, und nur in Kombination mit Automatisierungsmethoden (s. nächster Absatz) möglich. Da die Identifikation tumor- und metastasierungs-spezifischer Gene ein sehr aktueller Forschungsschwerpunkt ist, und dieser Studie sicherlich weitere in anderen Systemen folgen werden, wird die Identifikation all dieser Gene in absehbarer Zeit möglich sein. Eine Vervollständigung dieses Bildes kann mit der Identifizierung des kompletten menschlichen Genoms (*Human Genome Projekt*) in einigen Jahren gelingen.

Der zeit- und arbeitsintensivste Schritt der SSH-Analyse ist die der Subtraktionsreaktion folgende Nachselektion. Da ich in meiner Arbeit bestrebt war, einen möglichst umfassenden Satz von metastasierungsassoziierten Genen zu erhalten und es zu Beginn meiner Arbeit weder einen Hinweis darauf gab, wie groß die Anzahl dieser metastasierungsspezifischen Gene sein könnte, noch wie hoch die Effizienz der SSH-Analyse sein würde, habe ich mich für die Isolation von nahezu 2000 Klonen entschieden. Da die Analyse von 2000 Klonen über *Northern-Blot*-Analysen technisch nicht möglich ist, wurde hierfür die *Reverse-Northern-Blot*-Analyse eingesetzt. Dennoch machen aufwendige Elektrophorese- und Transfertechniken, sowie eine Expositionszeit der Autoradiogramme von mindestens einer Woche, diese Technik zu einem arbeitsaufwendigen und langwierigen Verfahren.

Eine Automatisierung durch die Microarraytechnologie (Skena *et al.*, 1995) könnte diese Nachselektion zeitlich sehr verkürzen und könnte zur Detektion weiterer metastasierungsspezifischer Sequenzen in der ML-Bank führen. Auf einem solchen Mikroarray können bis zu 10.000 cDNA-Fragmente auf eine Fläche von 2,5 x 2,5 cm aufgetragen werden. Die Hybridisierung erfolgt durch fluoreszenz-markierte Einzelstrang-cDNA. Die effektivste Detektion metastasierungsspezifischer Sequenzen würde durch Verwendung der subtrahierten Bank als Hybridisierungssonde gelingen.

Für die Abläufe bei der Metastasierung ist eine Vielzahl von Genen notwendig, die durch ein oder wenige Kontrollgene als pleiotrope Antwort induziert werden können und somit sekundär oder tertiär aktivierte Gene darstellen. Bei einer Differenzanalyse, die wie hier in einem etablierten Zellsystem durchgeführt wird, erhält man eben gerade dieses breite Spektrum an Genen. Es ist möglich, daß sich unter den hier identifizierten Genen der eine oder andere Kandidat für einen pleiotropen Effektor (wie ihn z.B. *c-met* darstellt) oder für ein Mastergen bei der Metastasierung befindet, dennoch wäre eine vorrangige Identifikation von kritischen Mastergenen nur unter Verwendung eines induzierbaren Systems (z.B. Oft *et al.*, 1996) möglich.

Ausgehend von der Annahme, daß metastasierenden Zellen ein gewisser Satz an Genen, die für den metastatischen Phänotyp verantwortlich sind, gemein sein könnte, wurde die Expression einiger ausgewählter Gene der ML-Bibliothek in anderen Tumorprogressionssystemen untersucht. Dabei zeigte sich, daß nahezu alle diese Gene auch in dem Prostata- und dem Pankreastumorprogressionssystem metastasierungs-spezifisch exprimiert werden. Es handelt sich daher bei den isolierten Sequenzen überwiegend um solche, die ganz allgemein in verschiedenen Tumorgeweben für den metastatischen Phänotyp verantwortlich sind. Dennoch ist es kein Widerspruch, wenn sich die Expression

mancher Gene wie *Novel 163* auf ein System beschränkt, da es ist nicht zwingend notwendig ist, daß die Eigenschaften, die eine Zelle zur Metastasierung befähigen, grundsätzlich von den gleichen Proteinen erbracht werden müssen. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, daß die Aktivierung eines Teils dieser metastasierungsspezifischen Gene je nach Tumor variiert.

Literaturrecherchen haben gezeigt, daß ein funktionelles Zusammenspiel einiger hier identifizierter Gene schon bekannt ist. Diese Verknüpfungen lassen kleine, wenn auch unvollständige Netzwerke entstehen. Dies trifft auf c-Met und Ezrin zu. Ezrin, welches in Adenokarzinomen des Pankreas mit dem metastatischen Phänotyp assoziiert ist (Akisawa *et al.*, 1999), stellt ein zytoplasmatisches Substrat für c-Met dar und wird für die HGF-vermittelte Morphogenese benötigt (Crepaldi *et al.*, 1997). c-Met wiederum, der Rezeptor für HGF/SF (*Hepatocyte growth factor/scatter factor*), ist sehr wahrscheinlich in den Prozeß von Tumorgenese, Invasion und Metastasierung involviert und seine Expression korreliert mit dem Grad der Tumorprogression (Yamashita *et al.*, 1994: Übersichtsartikel: Vande Woude *et al.*, 1997). Auch zwischen anderen in der ML-SSH identifizierten Genen ist eine Verbindung bereits in der Literatur beschrieben worden. Ein weiteres Beispiel dafür ist IQGAP2, ein *ras*/GAP-verwandtes Protein, welches mit dem gleichfalls identifizierten Calmodulin interagiert (Brill *et al.*, 1996). Bestimmte Calmodulin-abhängige Kinasen phosphorylieren in proliferierenden Zellen ihrerseits Substrate wie das ebenfalls isolierte EF-2 (Basaglio *et al.*, 1993).

Das 13762NF-System setzt sich aus Zelllinien unterschiedlichen Metastasierungspotentials zusammen. Die Hybridisierungen von Genen aus der ML-Bank mit den verschiedenen 13762NF-Zelllinien zeigen, ob die Expression eines Gens mit der Zunahme der metastatischen Aggressivität ansteigt oder ob es bereits in schwach metastatischen Linien sehr hoch exprimiert wird. Die Bedeutung eines Gens, welches von schwach und stark metastasierenden Zellen im gleichem Maße exprimiert wird, könnte dahingehend interpretiert werden, daß die Funktion des Proteins für die Metastasierung notwendig ist. Ein Beispiel dafür wäre die Überexpression von B23 (NPM, Nucleophosmin, Numatrin) in allen metastasierenden Zelllinien im Vergleich zu den nicht metastasierenden. Da B23 das Tumorsuppressorgen IRF-1 hemmt (*Interferon regulatory factor*; Kondo *et al.*, 1997), könnte man folgern, daß die Inhibition von IRF-1 durch B23 der, oder einer der initialen Schritte zur Metastasierung darstellen könnte. Tatsächlich kann man experimentell durch Überexpression von B23 in NIH3T3 Nagerzellen deren maligne Transformation bewirken (Kondo *et al.*, 1997).

Im Falle von Cholinase steigt die Expression eines Gens mit der metastatischen Aggressivität der Zelllinien an. Da Cholinase ein Promotor des Zellzyklus ist (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997), wäre eine mögliche Schlußfolgerung, daß infolge

erhöhter Proliferation, mehr Zellen disseminieren könnten, gesetzt den Fall, daß sie auch die erforderlichen Eigenschaften dazu besitzen. Dadurch würde die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß letztendlich mehr Zellen im Blutkreislauf überleben und sich an sekundären Orten niederlassen können, um dort Metastasen zu bilden. Auch HB2 wird zunehmend vermehrt in Zellen mit höherem metastatischen Potential exprimiert. HB2 ist ein Lipoproteinrezeptor, der bislang nur in Zusammenhang mit Herzerkrankungen beschrieben wurde. Die Beobachtung, daß HB2 durch Interaktion mit HDL die adhäsions-induzierten Entzündungsprozesse in den Verletzungen der Gefäßwände reduzieren kann (Matsumoto *et al.*, 1997), gibt Anlaß zur Spekulation einer unterstützenden Rolle von HB2 bei der Extravasation von Tumorzellen in das umliegende Gewebe.

Die aus der Differenzanalyse resultierende ML-Bibliothek stellt eine Bank von Fragmenten überexprimierter Gentranskripte bei der Metastasierung dar. Unter diesen Sequenzen befindet sich das virale Retrotransposon EKER, welches durch Insertion in Gene deren Transkription verändern oder unterbrechen kann (Xiao *et al.*, 1995). Daher ist es möglich, daß durch veränderte oder fehlende Transkription eines oder mehrerer Gene der MTLY-Linie eine metastasierungsinduzierende Mutation verursacht wurde.

Eine Reihe der in dieser Arbeit identifizierten Gene zeigt Kreuzhybridisierung mit humanen Sequenzen und eignet sich daher für Expressionsstudien in humanen Tumoren. Exemplarisch wurden zwei Gene, CD24 und S7, untersucht. Eine Untersuchung der Expression in der Gesamt-RNA von Tumoren durch *Northern-Blot*-Analyse ist nicht sensitiv genug und war nur bei S7 durchführbar. Expressionsstudien mit mRNA könnten dieses Sensitivitätsproblem umgehen, jedoch ist die Ausbeute bei der Präparation von Poly(A)⁺ RNA aus Operationsmaterial begrenzt. Eine erste Idee, dieser Problematik zu begegnen, war die Herstellung von *full-length*-Expressionsbibliotheken aus der RNA von Tumoren unter der Verwendung des SMART-Kits (Clontech), mit nachfolgender Amplifikation der vollständigen cDNA unter Einsatz spezieller PCR-Primer. Dadurch konnte zwar das Sensitivitäts- und Mengenproblem gelöst werden, allerdings entsprach die Repräsentation der cDNAs in der SMART-Expressionsbibliothek nicht der tatsächlichen Repräsentation der exprimierten Transkripte (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt).

Die Methode der Wahl war schließlich die *in-situ*-Hybridisierungstechnik, die eine sensitive Detektion exprimierter Gene erlaubt. Darüberhinaus steht genügend Untersuchungsmaterial zu Verfügung, da man aus einem Tumor viele Schnitte anfertigen kann. Sie bietet auch den Vorteil, daß die Tumorzellen von anderen Zellen im Gewebe unterscheidbar sind und daher eindeutige Aussagen über tumorspezifische Expression gemacht werden können. Für die ISH wurden invasive duktales Karzinome zweier Gewebe, Brust und Kolorektum, gewählt.

Bei den verwendeten kolorektalen Tumoren war eine Expressionsstudie im Tumor- und Normalgewebe auf dem gleichen Gewebeschnitt möglich.

Beide für die *in-situ*-Hybridisierung ausgewählten Gene zeigten hierbei ein spezifisches Signal in den Tumorzellen der Karzinome. Im Kolonkarzinom war jeweils nur ein sehr schwaches Signal in den Mukosazellen zu detektieren. Im folgenden seien diese beiden Gene genauer vorgestellt.

Eine erhöhte Expression von **CD24*** in Tumoren ist zwar schon häufiger beschrieben worden (Droz *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1992; Akashi *et al.*, 1994), allerdings wurde in dieser Arbeit zum erstenmal eine direkte Verbindung von CD24 und Metastasierung gezeigt. Funktionell wäre aufgrund seiner strukturellen Besonderheit (GPI-Anker) eine Rolle bei der Signalübertragung denkbar (Fischer *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1991; Nedelec *et al.*, 1992). Konkreter sind die Hinweise auf eine mögliche Rolle von CD24 bei der Migration von Tumorzellen. CD24 als ein Ligand für P-Selektin könnte eine vermittelnde Rolle bei der Bindung von zirkulierenden Tumorzellen an das Endothelium spielen (Aigner *et al.*, 1997; Aigner *et al.*, 1998). Dadurch könnte erklärt werden, warum seine Expression in den Tumorprogressionsstudien direkt korrelierend mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen ansteigt.

In erster Linie ist CD24 allerdings als immunologisches Markermolekül bei der Reifung von B- und T-Lymphozyten beschrieben worden (Melink & LeBien, 1983; Pirruccello *et al.*, 1986). In letzter Zeit wurden CD24 noch weitere Funktionen zugeschrieben; so wird es zum Beispiel als Inhibitor neuronalen Wachstums diskutiert (Shewan *et al.*, 1996) oder als neuer Keratinozytendifferenzierungsmarker ausgewiesen (Magnaldo *et al.*, 1996).

Gene, die unter anderen funktionellen Gesichtspunkten beschrieben wurden, können durch Isolierung aus einer metastasierungsspezifischen Bank eine völlig neue Bedeutung erlangen. Ein besonders aussagekräftiges Beispiel dafür ist das **ribosomale Gen S7**. Die *in-situ*-Hybridisierungen zeigen, daß nahezu keine Expression des ribosomalen Proteins S7 in normalem Kolongewebe nachzuweisen ist, wohingegen eine signifikante Überexpression in den intraduktalen Karzinomen festgestellt werden konnte. Auch im invasiven Mammakarzinom wird S7 sehr stark exprimiert. Ein erster Gedanke wäre, die verstärkte Expression des ribosomalen Proteins S7 mit einer verstärkten Proliferationsrate eines Karzinoms im Vergleich zu seiner Umgebung zu erklären. Doch die verstärkte Expression

* CD24 (*Cluster of Differentiation*), auch bezeichnet als HSA (*Heat Stable Antigen*), J11d, Nectadrin

von S7 in Tumorzellen korreliert nicht mit der Proliferationsrate, da selbst in der hoch proliferativen Kolonmukosa nur sehr schwache Expression nachgewiesen werden konnte.

Als entscheidende RNA-Bindekomponente wird S7, welches auf der externen Oberfläche der 40S-Untereinheit der Ribosomen lokalisiert ist, für die richtige Faltung der großen 3'-Domäne der 16S ribosomalen RNA benötigt (Lutsch *et al.*, 1990; Wimberley *et al.*, 1997). Für den Translationsprozeß ist allerdings nur je ein Molekül der 80 verschiedenen ribosomalen Proteine notwendig, so daß die in manchen Fällen beobachtete massive Überexpression einzelner Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, größtenteils noch unklar ist (pers. Mitteilung J. Stark). In den letzten Jahren konnten bei einigen ribosomalen Proteinen Hinweise auf weitere Aufgaben gefunden werden (Kim *et al.*, 1995; Witte *et al.*, 1997; Kimball *et al.*, 1999; Moorthamer *et al.*, 1999).

Auch wenn eine Aktivierung verschiedener ribosomaler Komponenten bei der Tumorgenese beobachtet wurde (Pogue-Geile *et al.*, 1991; Denis *et al.*, 1993; Vaarala *et al.*, 1998), gibt es in der Literatur, abgesehen von der Identifikation durch SAGE in Tumorzelllinien (Zhang *et al.*, 1997, s. Abb. 25), keinen Hinweis auf eine Verbindung von S7 zur Tumorgenese, bzw. -progression. Daher sprechen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen für eine neue, bislang noch unbekannte Funktion von S7, möglicherweise mit seinen strukturellen Eigenschaften zusammenhängend, die S7 zur Bindung an alle Arten von RNA (Wimberley *et al.*, 1997) und an verschiedene Proteine, wie z. B. an das Autoantigen L7 (Witte *et al.*, 1997) befähigen.

In den Karzinomen wird S7 in einer homogenen Weise exprimiert, d. h., eine Expression ist gleichermaßen in sich entwickelnden, wie in fortgeschrittenen Karzinomstrukturen der Gewebeschnitte zu detektieren. Diese homogene Verteilung läßt darauf schließen, daß S7 breits in einem frühen Stadium dieser Karzinome sehr stark exprimiert wird. Daher wäre S7 möglicherweise ein vielversprechender Kandidat für die Prognostizierung von Karzinomen.

Um weitere Informationen über die beiden Metastasierungsmarker S7 und CD24 zu erhalten, wurde ihre Expression in verschiedenen Geweben der Ratte untersucht. Da diese Expressionsstudie auf *Northern-Blot*-Ebene durchgeführt wurde, kann die detektierte Expression nicht auf einen bestimmten Zelltyp zurückgeführt werden. Auch könnte die Expression nur bestimmter Zellpopulationen im Gewebe durch andere, nicht exprimierende Zellen "maskiert" werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung der fehlenden oder schwachen Expression des Lymphozytendifferenzierungsmarkers CD24 in den lymphatischen Organen. Das ribosomale Protein S7 zeigt wie erwartet, eine gleichmäßigere Expression in den Geweben als CD24. Als essentielles Protein für die Translation muß es in jedem Gewebe und jedem Zelltyp exprimiert werden. Da es in den normalen Zellen der menschlichen Karzinome sehr schwach exprimiert wurde, scheint eine geringe

Transkriptionsrate für diese essentielle Funktion ausreichend zu sein. Es muß also einen anderen Grund dafür geben, daß S7 in den Tumorzellen dermaßen überexprimiert wird.

Resumé und Perspektiven

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine große Anzahl von Genen während der Progression zur metastatischen Kompetenz hochreguliert ist. Darüberhinaus wurde eine Assoziation der Expression bestimmter Gene mit dem metastatischen Phänotyp in verschiedenen Tumorprogressionssystemen nachgewiesen. Es konnte bestätigt werden, daß die Expression einiger bereits im Zusammenhang mit Tumorprogression beschriebener Gene mit dem metastatischen Phänotyp assoziiert ist. Doch der entscheidende Punkt ist der, daß es gelungen ist, noch völlig unbekannte Gene zu identifizieren, die ganz spezifisch in metastatischen Zellen exprimiert werden. Neben dem bereits im Zusammenhang mit Tumorprogression beschriebenen Gen CD24 gelang der Nachweis der spezifischen Expression in den Tumorzellen humaner Karzinome auch bei einem weiteren, in Bezug auf Karzinogenese aber noch völlig unbekanntem Gen, S7 (Nestl *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). S7 spielt in normalen Geweben eine essentielle Rolle bei der Translation. Die drastische Überexpression in Tumoren deutet auf eine völlig neue Funktion hin.

Die Daten dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß es Untergruppen von Genen gibt, die während der metastatischen Progression gemeinsam hochreguliert werden und einige dieser Gene, welche hierbei identifiziert wurden, können in Form diagnostischer oder therapeutischer Mittel bei der Behandlung von Krebs eine Rolle spielen. Die Identifikation neuer Metastasierungsmarker ist ein wichtiger Punkt im Kampf gegen den Krebs, da viele Patienten bei der Diagnose des Primärtumors bereits Mikrometastasen entwickelt haben, die jedoch oft asymptomatisch und klinisch nicht zu detektieren sind (Weinstat-Saslow & Steeg, 1994; Fidler & Ellis, 1994; Holmgren *et al.*, 1995).

Die in dieser Analyse identifizierten Gene stellen ein reiches Reservoir für weiterführende Studien in der Zukunft dar. Besonders die nähere Charakterisierung, funktionelle Analyse und Gesamt-Längen-Klonierung der humanen Sequenzen der 79 neuen Gene kann neue Perspektiven eröffnen. Eine Ausweitung der exemplarischen Expressionsstudie von CD24 und S7 in humanen Tumoren auf eine breitere Zahl von Genen könnte zur Identifizierung weiterer Tumormarker in humanen Karzinomen führen. Die Rolle von S7 als prognostischer Marker müßte noch in Karzinomen unterschiedlicher Stadien manifestiert werden.

So groß die Vorteile der Identifizierung einer großen Anzahl von metastasierungs-assoziierten Genen auch sind, so groß ist die Problematik, unter diesen vielen Genen, diejenigen auszuwählen, die von genereller Relevanz sind. Sowenig es möglich ist, mit allen diesen Genen funktionelle Untersuchungen zu tätigen, sowenig ist es sinnvoll, sich wahllos einige herauszugreifen. Die wirklich relevanten Gene unter den in der Differenzanalyse identifizierten für weitere Untersuchungen auszuwählen, kann nur über weiterführende Selektionsverfahren erfolgen. Sehr gute Hinweise auf mögliche Kandidatengene für generelle Signifikanz bei der Metastasierung geben Expressionsuntersuchungen in verschiedenen Tumorprogressionssystemen und in primären Tumoren, die bisher aber aus technischen Gründen nur mit einer beschränkten Anzahl von Genen möglich waren. Die nähere Untersuchung aller isolierten cDNA-Fragmente könnte mit Hilfe der Mikroarray-Technologie (Sчена *et al.*, 1995) durch die Hybridisierung mit Expressionsbanken verschiedener Tumore und Tumorsysteme erfolgen. Dies wäre eine Fortführung der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien auf Chipbasis, die die Untersuchung einer Vielzahl von Tumorprogressionsgenen zulassen würde. Die andere Möglichkeit wäre die Hybridisierung der isolierten cDNA-Fragmente auf Gewebe-Mikroarrays (Kononen *et al.*, 1998), die Schnitte von bis zu 1000 zylindrischen Gewebebiopsien aus einem Paraffinblock enthalten. Dadurch wäre es möglich, die 162 Gene der ML-Bank unter zahlreichen Aspekten, wie Gewebespezifität und Expression in Tumoren verschiedener Stadien und Gewebe zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

Aaltonen, L.A. *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer [see comments]. *Science* 260, 812-816 (1993).

Ahmad, A. & Hart, I.R. Biology of tumor micrometastasis. *J Hematother* 5, 525-535 (1996).

Aiello, L.P. *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders [see comments]. *N Engl J Med* 331, 1480-1487 (1994).

Aigner, S. *et al.* CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb J* 12, 1241-1251 (1998).

Aigner, S. *et al.* CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 89, 3385-3395 (1997).

Akashi, T., Shirasawa, T. & Hirokawa, K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch* 425, 399-406 (1994).

Akisawa, N., Nishimori, I., Iwamura, T., Onishi, S. & Hollingsworth, M.A. High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 395-400 (1999).

Altschul, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402 (1997).

Amundadottir, L.T., Nass, S.J., Berchem, G.J., Johnson, M.D. & Dickson, R.B. Cooperation of TGF alpha and c-Myc in mouse mammary tumorigenesis: coordinated stimulation of growth and suppression of apoptosis. *Oncogene* 13, 757-765 (1996).

Bagaglio, D.M., Cheng, E.H., Gorelick, F.S., Mitsiu, K., Nairn, A.C., Hait, W.N. Phosphorylation of elongation factor 2 in normal and malignant rat glial cells. *Cancer Res* 53, 2260-2264 (1993).

Bang, Y.J. *et al.* Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5330-5334 (1994).

Banville, D. & Boie, Y. Retroviral long terminal repeat is the promoter of the gene encoding the tumor-associated calcium-binding protein oncomodulin in the rat. *J Mol Biol* 207, 481-490 (1989).

Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim Y.-M. & Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 59, 2825-2831 (1998).

Bernaert, D., Brewer, L.M., MacManus, J.P. & Galand, P. Immunocytochemical detection of the onco-developmental protein oncomodulin in pre-neoplastic and neoplastic hepatocellular lesions during hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer* 43, 719-727 (1989).

Bertram, J., Palfner, K., Hiddemann, W. & Kneba, M. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. *Anticancer Drugs* 9, 311-317 (1998).

Bishop, J.M. The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305-311 (1987).

Bleuel, K., Popp, S., Fusenig, N.E., Stanbridge, E.J. & Boukamp, P. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2065-2070 (1999).

Boice, J.D & Monson, R.R. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 823-835 (1977).

Bouchardy, C. et al., A. Primäre Prävention und Früherkennung. In: Brustkrebs, Fakten und Handlungsbedarf, Nationales Krebs-Bekämpfungsprogramm, Schweizerische Krebsliga (1996).

Bracke, M.E., Van Roy, F.M. & Mareel, M.M. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 213, 123-161 (1996).

Brandley, B.K. & Schnaar, R.L. Tumor cell haptotaxis on covalently immobilized linear and exponential gradients of a cell adhesion peptide. *Dev Biol* 135, 74-86 (1989).

Brill, S. et al., The ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol Cell Biol* 16 (9), 4869-4878 (1996).

Byrne, G. & Cox, E.C. Spatial patterning in Polysphondylium: monoclonal antibodies specific for whorl prepatterns. *Dev Biol* 117, 442-455 (1986).

Cailleau, et al., Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* , 661-674 (1974).

Cailleau, R., Olive, M. & Cruciger, Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14, 911-915 (1978).

Cairns, J. The origin of human cancers. *Nature* 289, 353-357 (1981).

Celis, J.E. et al. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* 56, 4782-4790 (1996).

Christenson, L.K. & Stouffer, R.L. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology* 137, 367-374 (1996).

Claffey, K.P. & Robinson, G.S. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **15**, 165-176 (1996).

Crepaldi, T., Gautreau, A., Comoglio, P.M., Louvard, D. & Arpin, M. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol* **138**, 423-434 (1997).

Denis, M.G. et al. Over-expression of the S13 ribosomal protein in actively growing cells. *Int J Cancer* **55**, 275-280 (1993).

Di Renzo, M.F., Poulson, R., Olivero, M., Comoglio, P.M. & Lemoine, N.R. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **55**, 1129-1138 (1995).

Diatchenko, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-6030 (1996).

Droz, D. et al. Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas. *Am J Pathol* **137**, 895-905 (1990).

Duncan, L.M. et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**, 1515-1520 (1998).

Ebraldize, A. et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* **3**, 1086-1093 (1989).

Eckert, J., Helminthologie. In: Medizinische Mikrobiologie (Thieme-Verlag, 1993)

Elledge, S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672 (1996).

Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).

Fidler, I.J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* **38**, 2651-2660 (1978).

Fidler, I.J. & Ellis, L.M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**, 185-188 (1994)

Fischer, G.F., Majdic, O., Gadd, S. & Knapp, W. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol* **144**, 638-641 (1990).

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186 (1971).

Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**, 27-31. (1995).

- Foulds, L.** The natural history of cancer. *J. Chronic Dis* **8**, 2-37 (1958).
- Freije, J.M. et al.** Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* **269**, 16766-16773 (1994).
- Gavrilovic, J., Moens, G., Thiery, J.P. & Jouanneau, J.** Expression of transfected transforming growth factor alpha induces a motile fibroblast-like phenotype with extracellular matrix-degrading potential in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Regul* **1**, 1003-1014 (1990).
- Gilbert & Kagan.** Metastases: Incidence, detection, and evaluation without histologic confirmation. In *Fundamental Aspects of Metastasis* (Ed. Weiss) p. 385. North-Holland Publishing Co.: Amsterdam (1976).
- Gold, P. & Freeman, S.O.** Demonstration of tumor-specific antigens in human carcinomata by immunologic tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439 (1965).
- Gress, T.M. et al.** A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* **13**, 1819-1830 (1996).
- Gress, T.M. et al.** Identifikation of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA Representational Difference Analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer* **19**, 97-103 (1997).
- Gunthert, U. et al.** A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**, 13-24 (1991).
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E. & Trevor, K.T.** Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol* **150**, 483-495 (1997).
- Henikoff, S., Pietrokovski, S. & Henikoff, J.G.** Superior performance in protein homology detection with the blocks database servers. *Nucleic. Acid. Res.* **26**, 309-312.
- Hernandez-Alcoceba, R. et al.** Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* **15**, 2289-2301 (1997).
- Hoffman, S. & Edelman, G.M.** Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 5762-5766 (1983).
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. & Folkman J.** Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* **1/2**, 149-153 (1995)
- Holzner,** Histologische Tumorklassifikation. 2nd edition. Springer Verlag Wien New York (1994).
- Hurley, S.F. & Kaldor J.M.** The benefits and risks of mammographic screening for breast cancer. *Epidemiol Rev* **14**, 101-130 (1992).

Ionov Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558-561 (1993).

Isaacs, J.T., Isaacs, W.B., Feitz, W.F. & Scheres, J. Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *Prostate* **9**, 261-281 (1986).

Jackson, D., Waibel, R., Weber, E., Bell, J. & Stahel, R.A. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res* **52**, 5264-5270 (1992).

Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi M., Butcher E.C. Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol.* **141**, 1615-1623 (1988).

Kang, D.C., LaFrance, R., Su, Z.Z. & Fisher, P.B. Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13788-13793 (1998).

Kaufmann, M. *et al.* CD44 isoforms in prognosis of breast cancer [letter; comment]. *Lancet* **346**, 502 (1995).

Kay, R., Rosten, P.M. & Humphries, R.K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* **147**, 1412-1416 (1991).

Kim U. Pathogenesis and characteristics of spontaneously metastasizing mammary carcinomas and the general principle of metastasis. *J Surg Oncol* **33**, 151-165 (1986).

Kim, J. *et al.* Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *J Biol Chem* **270**, 13620-13629 (1995).

Kim, J., Wu, W., Kovalski, K. & Ossowski, L., Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantative PCR-Based Assay. *Cell* **94**, 353-362 (1998).

Kimball, S.R., Shantz, L.M., Horetsky, R.L. & Jefferson, L.S. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* **274**, 11647-11652 (1999).

Kinsella, A.R., Lepts, G.C., Hill, C.L., Jones, M. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **12**, 335-342 (1994).

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers [news; comment]. *Nature* **386**, 761, 763 (1997).

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain [comment]. *Science* **280**, 1036-1037 (1998).

Knudson, A.G., Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* **45**, 1437-1443 (1985).

Knudson, A.G. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10914-10921 (1993).

Kobayashi, T., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Kubo, Y. & Hino, O. A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer [published erratum appears in *Nat Genet* 1995 Feb;9(2):218]. *Nat Genet* **9**, 70-74 (1995).

Kojima, T. et al. Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. *J Biol Chem* **270**, 21984-21990 (1995).

Kondo, S., Asano, M. & Suzuki, H. Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 1234-1241 (1993).

Kondo, T. et al. Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* **15**, 1275-1281 (1997).

Kononen, J et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling for tumor specimens. *Nature Medicine*, **4**, 844-847 (1998).

Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M. & Montenarh, M. Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* **62**, 4737-4744 (1988).

Kuang, W.W., Thompson, D.A., Hoch, R.V. & Weigel, R.J. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor- positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* **26**, 1116-1123 (1998).

LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G. & MacKenzie, A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259 (1998).

La Vecchia D., Lucchini, F., Negri, E., Boyle P., Maisonneuve, P. & Levi, F. Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989. *Eur J Cancer* **28A**, 927-998 (1992).

Lamb, R.F. et al. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol* **7**, 682-688 (1997).

Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649 (1998).

Lee, K.S. Requirement for neuroregulin receptor, erbB2, in neural and cardiac development. *Nature* **379**, 394-396 (1995)

Levi, F., La Vecchia, C., Schüler, G., Bopp, M. & Tschopp A. Vorkommen von Brustkrebs: Fakten und Trends. In: Brustkrebs, Fakten und Handlungsbedarf, Nationales Krebs-Bekämpfungsprogramm, Schweizerische Krebsliga (1996).

Liang, P. & Pardee, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* **257**, 967-971 (1992).

Liotta, L.A. et al. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3302-3306 (1986).

Liotta, L.A., Steeg, P.S. & Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**, 327-336 (1991).

Liotta, L.A. & Stetler-Stevenson, W.G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* **51**, 5054s-5059s (1991).

Lisitsyn, N. & Wigler, M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-951 (1993).

Liston, P. et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349-353 (1996).

Lutsch, G., Stahl, J., Kargel, H.J., Noll, F. & Bielka, H. Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur J Cell Biol* **51**, 140-150 (1990).

Magnaldo, T. & Barrandon, Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J Cell Sci* **109**, 3035-3045 (1996).

Manni, A., Grove, R., Kunselman, S. & Aldaz, M. Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett* **92**, 49-57 (1995).

Matrisian, L.M. & Hogan, B.L. Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol* **24**, 219-259 (1990).

Matrisian, L.M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* **14**, 455-463 (1992).

Matsumoto, A. et al. Cloning and characterization of HB2, a candidate high density lipoprotein receptor. Sequence homology with members of the immunoglobulin superfamily of membrane proteins. *J Biol Chem* **272**, 16778-16782 (1997).

Matzku, S., Komitowski, D., Mildenerger, M. & Zoller, M. Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* **3**, 109-123 (1983).

McDonnell, S., Navre, M., Coffey, R.J., Jr. & Matrisian, L.M. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP- 7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog* **4**, 527-533 (1991).

Melink, G.B. & LeBien, T.W. Construction of an antigenic map for human B-cell precursors. *J Clin Immunol* **3**, 260-267 (1983)

Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer Vol. 2 (Wiley-Liss, New York, 1994).

Montuori, N. & Sobel, M.E. The 67-kDa Laminin Receptor and Tumor Progression. In: Attempts to Understand Metastasis Formation (Springer Verlag, 1996)

Moorthamer, M. & Chaudhuri, B. Identification of ribosomal protein L34 as a novel Cdk5 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 631-638

Muller, D. et al. Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* **53**, 165-169 (1993)

Neri, A., Ruoslahti, E. & Nicolson, G.L. Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at primary and metastatic sites. *Cancer Res* **41**, 5082-5095 (1981a).

Neri, A. & Nicolson, G.L. Phenotypic drift of metastatic and cell-surface properties of mammary adenocarcinoma cell clones during growth in vitro. *Int J Cancer* **28**, 731-738 (1981b).

Neri A., Welch, D., Kawaguchi, T. & Nicolson, G. Development and Biologic Properties of Malignant Cell Sublines and Clones of a Spontaneously Metastasizing Rat Mammary Adenocarcinoma. *JNCI*, Vo. **68**, No. **3**, 507-517 (1982).

Nestl, A., von Stein, O., Zatloukal K., Sleeman, J.P., Thies, W.G., Ahrens C., Herrlich P. & Hofman M. (2000). Gene Expression Patterns Associated with the Metastatic Phenotype in Rodent and Human Tumors, zur Veröffentlichung eingereicht

Newell, K.J., Witty, J.P., Rodgers, W.H. & Matrisian, L.M. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog* **10**, 199-206 (1994).

Nicholson, S. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer* **63**, 146-150 (1991).

Norrby, K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *Apmis* **105**, 417-437 (1997).

North, S.M. & Nicolson, G.L. Effect of host immune status on the spontaneous metastasis of cloned cell lines of the 13762NF rat mammary adenocarcinoma. *Br J Cancer* **52**, 747-755 (1985).

Nuovo, G.J., MacConnell, P.B., Simsir, A., Valea, F. & French, D.L. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction- amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* **55**, 267-275 (1995).

Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H. & Reichmann, E. TGF- β 1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes & Development* **10**, 2462-2477 (1996).

O'Reilly, M.S., Rosenthal, R., Sage, E.H., Smith S., Holgrem, L., Moses, M., Shing, Y. and Folkman, J. The suppression of tumor metastases by a primary tumor. *Surg. Forum*, **44**: 474-476 (1993).

- O'Reilly, M.S. et al.** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]. *Cell* **79**, 315-328 (1994).
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C. & Folkman, J.** Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* **2**, 689-692 (1996).
- O'Reilly, M.S. et al.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285 (1997).
- O'Rourke, M.J.** Tumor markers. In: Medical Oncology, second Edition (Editors: Calabresi P. & Schein, P.S.), 163-172 (1993).
- Okada, A. et al.** Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2730-2734 (1995).
- Pajouh, M.S. et al.** Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **117**, 144-150 (1991).
- Parkin D.M., Muir C.S., Whelan, S.L., Gao, Y.T., Ferlay J. & Powell J.** Cancer incidence in five continents, Vol VI. *IARC Sci Publ* **120** (1992).
- Pencil, S.D., Toh, Y. & Nicolson, G.L.** Candidate metastasis-associated genes of the rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **25**, 165-174 (1993).
- Perri, R.T., Royston, I., LeBien, T.W. & Kay, N.E.** Chronic lymphocytic leukemia progenitor cells carry the antigens T65, BA-1, and Ia. *Blood* **61**, 871-875 (1983).
- Pirruccello, S.J. & LeBien, T.W.** The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol* **136**, 3779-3784 (1986).
- Pogue-Geile, K. et al.** Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* **11**, 3842-3849 (1991).
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B.** A model for p53-induced apoptosis [see comments]. *Nature* **389**, 300-305 (1997).
- Polyak, K. et al.** Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* **20**, 291-293 (1998).
- Ponta, H. & Herrlich, P.** The CD44 protein family: Roles in embryogenesis and tumor progression. *Frontiers in Bioscience* **3**, 650-656 (1998).
- Poste, G. & Fidler, I.J.** The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**, 139-146 (1980).
- Price, J.T., Bonovich, M.T. & Kohn, E.C.** The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**, 175-253 (1997).
- Risau, W.** What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev* **15**, 149-151 (1996).

Rosel, M., Claas, C., Seiter, S., Herlevsen, M. & Zoller, M. Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* **17**, 1989-2002 (1998).

Rudy, W. et al. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* **53**, 1262-1268 (1993).

Ruiz, P., Dunon, D., Sonnenberg, A. & Imhof, B.A. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins [published erratum appears in *Cell Adhes Commun* 1993 Sep;1(2):following 190]. *Cell Adhes Commun* **1**, 67-81 (1993).

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470 (1995).

Schmid, M., Haaf, T. & Grunert, D. 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Hum Genet* **67**, 257-263 (1984).

Schoenfeld, A., Luqmani, Y., Sinnott, H.D., Shousha, S. & Coombes, R.C. Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients [see comments]. *Br J Cancer* **74**, 1639-1642 (1996).

Shewan, D. et al. mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurosci* **16**, 2624-2634 (1996).

Shirasawa, T. et al. Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. *Dev Dyn* **198**, 1-13 (1993).

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845 (1992).

Segaloff, A. Hormones and breast cancer. *Recent Prog. Horm. R.*, **22**:351-379 (1966)

Sidransky, D. Früherkennung und Diagnostik mit Tumormarkern. Spektrum der Wissenschaften (Scientific American), Spezial: Krebsmedizin Nr. 5, 47-52 (1996).

Siebert, P., Chenchik, A., Kellogg, D., Ed. Lukyanov, K. A. & Lukyanov., S. A. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087-1088 (1995).

Sivaparvathi, M. et al. Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion [published erratum appears in *Cancer Lett* 1996 Oct 1;107(1):161]. *Cancer Lett* **104**, 121-126 (1996).

Sleeman JP. The lymph nodes as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors *Recent Results in Cancer Research*, in press.

Sokolov, B.P. & Prockop, D.J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* **22**, 4009-4015 (1994).

Stauder, R., Eisterer, W., Thaler, J. & Gunthert, U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* **85**, 2885-2899 (1995).

Steeg, P.S. et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* **80**, 200-204 (1988).

Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A. & Keshet, E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* **15**, 5363-5368 (1995).

Tatusova, T.A. & Madden, T.L. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences [In Process Citation]. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 247-250 (1999).

Tlsty, T.D. Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 647-653 (1998).

Toh, Y., Pencil, S.D. & Nicolson, G.L. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* **269**, 22958-22963 (1994).

Toh, Y., Pencil, S.D. & Nicolson, G.L. Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, mta1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. *Gene* **159**, 97-104 (1995).

Vaarala, M.H. et al. Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer* **78**, 27-32 (1998).

Vande Woude, G.F. et al. Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found Symp* **212**, 119-130 (1997).

Varki, N.M., Reisfeld, R.A. & Walker, L.E. Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* **44**, 681-687 (1984).

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Serial analysis of gene expression [see comments]. *Science* **270**, 484-487 (1995).

Vogelstein, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-532 (1988).

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**, 138-141 (1993).

von Stein, O.D., Thies, W.G. & Hofmann, M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2598-2602 (1997).

von Stein O. D., Novel genes involved in metastasis. *Dissertation* (1998).

Wauters, C.C., Smedts, F., Gerrits, L.G., Bosman, F.T. & Ramaekers, F.C. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum Pathol* **26**, 852-855 (1995).

Weidner, K.M., Hartmann, G., Sachs, M. & Birchmeier, W. Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**, 229-237 (1993).

Weinberg, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* **49**, 3713-3721 (1989).

Weinstat-Saslow, D. & Steeg, P.S. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: Basic and applied advances. *FASEB J.* **8**, 401-407 (1994).

Wielenga, V.J. et al. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* **33**, 82-87 (1998).

Wilkinson, D.G. in "In Situ Hybridizations: A Practical Approach" Ed. D.G. Wilkinson, IRL Press, Oxford., 1-14 (1992).

Williams, C.V., Stechmann, C.L. & McLoon, S.C. Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens. *Biotechniques* **12**, 842-847 (1992).

Williamson, R.A. et al. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J* **268**, 267-274 (1990).

Wimberly, B.T., White, S.W. & Ramakrishnan, V. The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a beta-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids. *Structure* **5**, 1187-1198 (1997).

Witte, S. & Krawinkel, U. Specific interactions of the autoantigen L7 with multi-zinc finger protein ZNF7 and ribosomal protein S7. *J Biol Chem* **272**, 22243-22247 (1997).

Xiao, G.H., Jin, F. & Yeung, R.S. Germ-line Tsc2 mutation in a dominantly inherited cancer model defines a novel family of rat intracisternal-A particle elements. *Oncogene* **11**, 81-87 (1995).

Yamashita, J. et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* **54**, 1630-1633 (1994).

Yang, G.P., Ross, D.T., Kuang, W.W., Brown, P.O. & Weigel, R.J. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* **27**, 1517-1523 (1999).

Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C. & Wahl, G.M. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**, 937-948 (1992).

Yokoyama, N., Shirai, Y. & Hatakeyama, K. Immunohistochemical detection of lymph node micrometastases from gallbladder carcinoma using monoclonal anticytokeratin antibody. *Cancer* **85**, 1465-1469 (1999).

Zhang, R.D., Fidler, I.J. & Price, J.E. Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis* **11**, 204-215 (1991).

Zhang, L. et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276**, 1268-1272 (1997).

Zhuang, Z. et al. Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **20**, 66-69 (1998).

Eigene Publikationen:

Alexander Reuter, Andrea Nestl, Ralf M. Zwacka, Jan Tuckermann, Rüdiger Waldherr, Eva-Maria Wagner, Matti Höyhty, Angela M. Meyer zum Gottesberge, Peter Angel und Hans Weiher (1998). Expression of the Recessive Glomerulosclerosis Gene Mpv17 Regulates MMP-2 Expression in Fibroblasts, the Kidney, and the Inner Ear of Mice, *Molecular Biology of the Cell*, **Vol. 9**, 1675-1682.

Nestl, A., von Stein, O., Zatloukal K., Sleeman, J.P., Thies, W.G., Herrlich P. und Hofman M. (2000). Gene Expression Patterns Associated with the Metastatic Phenotype in Rodent and Human Tumors, zur Veröffentlichung eingereicht

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik und Toxikologie (ITG) des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt. Unterstützt wurde sie durch Fördermittel der Mildred-Scheel-Stiftung.

Herrn Professor Dr. Peter Herrlich danke ich für Übernahme des Erstgutachtens, für sein Interesse und hilfreiche Anregungen, Herrn Dr. Martin Hofmann möchte ich für Bereitstellung des Themas danken, und Herrn PD Dr. Harald Krug für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Jonathan Sleeman für sein stets offenes Ohr, viele hilfreiche Diskussionen und vor allem für seine wertvolle Arbeit bei der Anfertigung des Manuskriptes für die Veröffentlichung danken.

Ein ganz großer Dank gilt Prof. Dr. Helmut Ponta für seine Diskussionsbereitschaft und hilfreiche Kritik.

Meinen großen Dank möchte ich auch Herrn Dr. Wolf-Gerolf Thies für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Datenbankanalyse aussprechen.

Herrn Dr. Kurt Zatloukal, Pathologie Graz, möchte ich für die Möglichkeit danken, 2 Wochen in seinem Institut arbeiten und vieles lernen zu können, und ganz besonders für die wertvolle Zusammenarbeit.

Andrea Fuchsbichler, Pathologie Graz, und Debbie Barton danke ich für die Einführung in die *in-situ*-Hybridisierungstechnologie und Monika Pech möchte ich für die Einweihung in die Geheimnisse ihrer RNA-Präparations-Technik danken.

Ein besonderer Dank gilt den Leuten vom IGEN für freundschaftliche Atmosphäre, ganz besonders Axel, Diecki, Dina, Helen, Jaya, Jörg, Maria, Natasha & Woschka, Oli, Pawan, Sonja, Svetlana, Tom (Spezialdank), Veronique und allen andern.

Diecki und Oli möchte ich für meist viel Spass im Labor und angeregte wissenschaftliche Diskussionen danken und Jörg für die Rettung verschwundener Dateien. Sabine, Clarissa und Helen danke ich für den Gebrauch des tatsächlichen und Diecki für den Gebrauch des virtuellen Rotstiftes beim Korrekturlesen.

Diecki und Lara möchte ich für Ihre Geduld mit mir in den Wochen des Zusammenschreibens danken.

Und ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für alles bedanken.

Diese Arbeit ist meiner Tochter Lara gewidmet, die mir mit ihrem Optimismus und ihrem lieben Wesen immer sehr geholfen hat.